



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“PREPARACIÓN DE FILMS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDO
CON FLAVONOIDES TOTALES DE ÑACHAK (*Bidens andicola*)”.**

Trabajo de titulación

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR: HERNÁNDEZ MANZANO ALEX SEBASTIÁN

TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

Riobamba-Ecuador
2018

© 2018, Alex Sebastián Hernández Manzano

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que el trabajo de investigación: “PREPARACIÓN DE FILMS A BASE DE QUITOSANO ENRIQUECIDO CON FLAVONOIDES TOTALES DE ÑACHAK (*Bidens andicola*).” de responsabilidad del señor egresado Alex Sebastián Hernández Manzano, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza Tapia, M.Sc.
**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

BQF. Gisela Pilco Bonilla, M.Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Alex Sebastián Hernández Manzano, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación

Riobamba, 23 de febrero de 2018

ALEX SEBASTIÁN HERNÁNDEZ MANZANO

060409046-4

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos que gracias a su apoyo y esfuerzo especialmente el de mi madre Susana ha sido una fuerte inspiración y motivación para ser mejor persona y soportar todo tipo de adversidades.

Alex

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, a la Facultad de Ciencias y la Escuela de Bioquímica y Farmacia por haberme brindado los conocimientos y experiencia necesaria para volverme un profesional para tener un mejor futuro y aportar a la sociedad.

A mi tutor BQF. Diego Vinueza por su gran apoyo y asesoramiento en este trabajo de titulación y a lo largo de la carrera ya que su visión me ha enseñado a ser un mejor profesional y una persona con mejor pensamiento crítico.

A la BQF. Gisela Pilco por la ayuda brindada, la experiencia compartida y la excelente colaboración en el desarrollo del trabajo de titulación y como docente.

A toda mi familia y amistades por el apoyo en mis estudios.

Alex

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xvi
SUMMARY	xvii
CAPITULO I	
INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	7
<i>1.1 Plásticos</i>	<i>7</i>
<i>1.1.1 Problemática de los plásticos</i>	<i>7</i>
<i>1.1.2 Plásticos biodegradables</i>	<i>8</i>
<i>1.1.3 Aplicaciones de plásticos biodegradables</i>	<i>10</i>
<i>1.1.3.1 Aplicaciones Médicas.....</i>	<i>10</i>
<i>1.1.3.2 Aplicaciones Agrícolas.....</i>	<i>11</i>
<i>1.1.3.3 Aplicaciones para plásticos para empaque</i>	<i>11</i>
1.2 Quitina y quitosano	12
<i>1.2.1 La fabricación de quitina y quitosano</i>	<i>13</i>
<i>1.2.2 Características moleculares de quitina y quitosano:.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.3 Actividad antimicrobiana.....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.4 Películas activas (films) basados en quitosano.....</i>	<i>15</i>
1.3 Bidens andicola.	16
<i>1.3.1 Usos.....</i>	<i>17</i>
<i>1.3.2 Composición, principios activos y actividad farmacológica relacionada.</i>	<i>18</i>
1.4 Compuestos fenólicos.....	18
<i>1.4.1 Estructura química y clasificación.....</i>	<i>19</i>
<i>1.4.1.1 Fenoles simples, ácidos fenólicos y ácidos fenilacéticos</i>	<i>21</i>
<i>1.4.1.2 Ácidos cinámicos, cumarinas e isocumarinas.....</i>	<i>21</i>

1.4.1.3	<i>Lignanos y neolignanos</i>	22
1.4.1.4	<i>Taninos</i>	22
1.4.1.5	<i>Flavonoides y Chalconas</i>	23
1.4.1.6	<i>Estructura Química de los flavonoides</i>	23
1.4.1.7	<i>Clasificación de los flavonoides</i>	24
1.4.2	<i>Características físico químicas de los compuestos fenólicos</i>	25
1.4.3	<i>Acción antioxidante de los compuestos fenólicos</i>	25

CAPITULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	28
2.1	<i>Lugar de la investigación</i>	28
2.2	<i>Recolección del material vegetal</i>	28
2.3	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	28
2.3.1	<i>Material Vegetal</i>	28
2.3.2	<i>Reactivo Químico</i>	29
2.3.3	<i>Materiales de laboratorio utilizados</i>	29
2.3.4	<i>Equipos</i>	31
2.3.5	<i>Reactivos</i>	32
2.4	<i>Técnicas y métodos</i>	34
2.4.1	<i>Determinación de los parámetros de control de calidad de droga cruda</i>	34
2.4.1.1	<i>Determinación del contenido de humedad</i>	34
2.4.1.2	<i>Determinación de cenizas totales</i>	35
2.4.1.3	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	36
2.4.1.4	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico</i>	37
2.4.2	<i>Tamizaje fitoquímico</i>	38
2.4.2.1	<i>Ensayo de Sudán</i>	41
2.4.2.2	<i>Ensayo de Dragendorff</i>	41
2.4.2.3	<i>Ensayo de Mayer</i>	41

2.4.2.4	<i>Ensayo de Wagner</i>	41
2.4.2.5	<i>Ensayo de Baljet</i>	41
2.4.2.6	<i>Ensayo de Liebermann-Burchard</i>	42
2.4.2.7	<i>Ensayo de resinas</i>	42
2.4.2.8	<i>Ensayo de la espuma</i>	42
2.4.2.9	<i>Ensayo de cloruro férrico</i>	42
2.4.2.10	<i>Ensayo de Shinoda</i>	43
2.4.2.11	<i>Ensayo de Catequinas</i>	43
2.4.2.12	<i>Ensayo de Borntrager</i>	43
2.4.2.13	<i>Ensayo de Fehling</i>	43
2.4.3	<i>Preparación del extracto hidroalcohólico de Bidens andicola</i>	44
2.4.4	<i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico de Bidens andicola</i>	44
2.4.4.1	<i>Requisitos organolépticos</i>	44
2.4.4.2	<i>Determinación de sólidos totales</i>	45
2.4.4.3	<i>Índice de refracción</i>	45
2.4.4.4	<i>Medición del pH</i>	46
2.4.5	<i>Preparación del film</i>	46
2.4.6	<i>Análisis Infrarrojo (Caracterización de los films)</i>	47
2.4.7	<i>Densidad, contenido de humedad y opacidad</i>	47
2.4.8	<i>Solubilidad en Agua</i>	48
2.4.9	<i>Permeabilidad al vapor de agua</i>	48
2.4.10	<i>Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu</i>	49
2.4.11	<i>Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico</i>	50
2.4.12	<i>Actividad de captación del radical libre de DPPH</i>	50
2.4.13	<i>Análisis estadístico</i>	51

CAPITULO III

3	MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
----------	--	-----------

3.1	<i>Parámetros de control de calidad de la droga cruda.....</i>	52
3.2	<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	53
3.3	<i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico de B. andicola.....</i>	55
3.4	<i>Análisis Infrarrojo (Caracterización de los films).....</i>	56
3.5	<i>Densidad, contenido de humedad y opacidad</i>	57
3.6	<i>Solubilidad en Agua.....</i>	58
3.7	<i>Permeabilidad de Vapor de Agua</i>	59
3.8	<i>Contenido de fenoles totales</i>	60
3.9	<i>Contenido de flavonoides totales</i>	62
3.10	<i>Actividad captadora del radical libre DPPH'.....</i>	64
	CONCLUSIONES.....	67
	RECOMENDACIONES	68
	BIBLIOGRAFÍA.	
	ANEXOS.	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Descripción botánica de <i>Bidens andicola</i>	18
Tabla 2-1. Clasificación de los polifenoles y ejemplos de ellos	21
Tabla 1-2: Descripción de los materiales de laboratorio utilizados	29
Tabla 2-2: Equipos utilizados en la investigación.....	31
Tabla 3-2: Descripción de los reactivos utilizados.	32
Tabla 1-3: Resultados obtenidos del control de calidad de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	52
Tabla 2-3: Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	53
Tabla 3-3: Determinación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	55
Tabla 4-3. Densidad, contenido de humedad y opacidad de los films de quitosano/BAHE con diferentes concentraciones de BAHE.	57
Tabla 5-3. Solubilidad de agua (%) de los films de quitosano/BAHE	58
Tabla 6-3. Permeabilidad al vapor del agua de los films de quitosano/BAHE. Los resultados fueron expresados en (g mm m ⁻² día ⁻¹ kPa ⁻¹).....	59
Tabla 7-3: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico concentrado de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	60
Tabla 8-3. Contenido de fenoles totales de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo. Los resultados fueron expresados como (mg ácido gálico/g peso seco)	61
Tabla 9-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico concentrado de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>	62
Tabla 10-3. Contenido de flavonoides totales de los films de quitosano/BAHE. Los resultados fueron expresado como (mg quercetina/g peso seco)	63
Tabla 11-3. DPPH Actividad captadora de radicales libres (%) de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo.	65

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Estructura química de la quitina y quitosano	13
Figura 2-1. Flor de <i>Bidens andicola</i>	17
Figura 3-1. Estructura química del grupo fenol	19
Figura 4-1. Producción de compuestos fenólicos	20
Figura 5-1. Estructura básica de un flavonoide.....	24
Figura 6-1. Tipos de flavonoides	25
Figura 1-2. Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico.	39
Figura 2-2. Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.	40
Figura 3-2. Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.	40
Figura 4-2. Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3. ATR-FTIR espectro de los films de quitosano/BAHE	56
Gráfico 2-3. Solubilidad de agua de los films de quitosano/BAHE.....	58
Gráfico 3-3. Permeabilidad al vapor del agua de los films de quitosano/BAHE.	59
Gráfico 4-3. Contenido de fenoles totales de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo.	61
Gráfico 5-3. Contenido de flavonoides totales de los films de quitosano/BAHE.	63
Gráfico 6-3. DPPH Actividad captadora de radicales libres de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo.	65

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo A. Recolección del material vegetal.

Anexo B. Determinación del contenido de humedad de la droga cruda

Anexo C. Determinación de Cenizas totales de la droga cruda (Gráfico 1C) y determinación de cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico (Gráfico 2C).

Anexo D. Tamizaje fitoquímico.

Anexo E. Preparación del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *B. andicola* (Gráfico 1E), concentración del extracto (Gráfico 2E) y filtrado y obtención del extracto concentrado (Gráfico 3E).

Anexo F. Preparación de los films de quitosano/BAHE. Mezclado de los componentes del film (Gráfico 1F), Secado de los films de quitosano/BAHE (Gráfico 2F)

Anexo G. Films de quitosano/BAHE

Anexo H. Espectrofotómetro con el que se realizó los análisis para la caracterización de los films (Gráfico 1H) e infrarrojo (Gráfico 2H).

Anexo I. Curva de calibración de ácido gálico usada para la cuantificación de fenoles (Gráfico 1I) y curva de calibración de quercetina usada para la cuantificación de flavonoides totales (Gráfico 2I).

Anexo J. Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu

Anexo K. Ensayo de solubilidad de agua y contenido de humedad. Inmersión 24h en agua en agitación constante (Gráfico 1K) y secado de los films por 24h a 105° C (Gráfico 2K).

Anexo L. Ensayo de permeabilidad al vapor de agua de los films de quitosano/BAHE

Anexo M. Ensayo de contenido de fenoles totales.

Anexo N. Ensayo de contenido de flavonoides totales.

Anexo O. Ensayo de captación del radical libre DPPH

Anexo P. Análisis ANOVA de un factor de cada uno de los análisis realizados en los films de quitosano/BAHE.

Anexo Q. Análisis de Múltiples Rangos de Duncan para diferenciar los diferentes subconjuntos de grupos en cada uno de los análisis realizados a los films de quitosano/BAHE. Densidad (Gráfico 1P), Contenido de Humedad (Gráfico 2P), Opacidad (Gráfico 3P), Solubilidad en agua (Gráfico 4P), Permeabilidad al vapor de agua (Gráfico 5P),

Contenido de fenoles totales (Gráfico 6P), Contenido de flavonoides totales (Gráfico 7P), Capacidad de captación del radical libre DPPH (Gráfico 8P).

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue preparar películas activas (films) basadas en quitosano incorporando un extracto hidroalcohólico concentrado de *Bidens andicola* (BAHE) en diferentes concentraciones. El material vegetal se extrajo con etanol al 70% v/v en una relación (1:4), se concentró bajo condiciones controladas y el residuo obtenido constituyó el BAHE. Luego, se llevó a cabo la determinación de fenoles totales y el contenido total de flavonoides en BAHE para estandarizarlo. En tanto que la caracterización de las películas activas, se usó espectrometría infrarroja de reflectancia total atenuada (FT/IR) lo que a su vez permitió visualizar las interacciones potenciales entre el quitosano y los compuestos fenólicos y flavonoides de BAHE en las películas. Asimismo, propiedades físicas como el espesor, la densidad, el contenido de humedad, la opacidad, la solubilidad en agua, la permeabilidad al vapor de agua, fueron medidas. La actividad antioxidante de los films se relacionó con el contenido de fenoles totales y flavonoides de las películas mediante la actividad de captación de radicales libres de 2,2- difenil-1-picrilhidrazilo. Los resultados indicaron que la incorporación de BAHE causó interacciones entre el quitosano y los polifenoles/flavonoides del BAHE dando como resultado películas de apariencia más oscura. Después de la adición de BAHE, las películas mostraron una disminución tanto en la solubilidad en agua como en la permeabilidad al vapor de agua. Mientras que la incorporación de polifenoles y flavonoides de BAHE mejoró el contenido total de compuestos fenólicos y flavonoides además de su capacidad de captación de radicales libres de 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo de las películas en términos de actividad antioxidante. Sin embargo, la actividad antioxidante de las películas de quitosano incorporadas los polifenoles/flavonoides del BAHE disminuyó con el tiempo.

Palabras Clave: <BIOQUÍMICA>, <FITOQUÍMICA> <EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO>, <PELICULAS ACTIVAS>, <QUITOSANO>, <ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE>, <PROPIEDADES FISICAS>, <ÑACHAK (*Bidens andicola*)>.

SUMMARY

The objective of the research was to prepare active films based on chitosan incorporated a concentrated hydroalcoholic extract of *Bidens andicola* (BAHE) in different concentrations. The plant material was extracted with 70% ethanol v / v in a relation (1.4), it was concentrated under controlled conditions and the residue obtained constituted the BAHE, then, the determination of total phenols and the total content of flavonoids in BAHE was carried out to standardize it. While the characterization of the active films, attenuated total reflectance infrared spectrometry (FT / IR) was used, which in turn allowed to visualize the potential interactions between the chitosan and the phenolic and flavonoid compounds of BAHE in the films. Also, physical properties such as thickness, density, moisture content, opacity, water solubility, and water vapor permeability were measured. The antioxidant activity of the films was related to the content of total phenols and flavonoids of the films by the free radical scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. The results indicated that the incorporation of BAHE caused interactions between the chitosan and the polyphenols / flavonoids of BAHE resulting in darker-looking films. After the addition of BAHE, the films showed a decrease in both water solubility and water vapor permeability. While the incorporation of polyphenols and flavonoids from BAHE improved the total content of phenolic compounds and flavonoids in addition to their ability to capture free radicals of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl from the films in terms of antioxidant activity. However, the antioxidant activity of the incorporated polyphenols / flavonoids of the BAHE incorporated chitosan films decreased with time.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHYTOCHEMISTRY>, <HYDRO-ALCOHOLIC EXTRACT>, <ACTIVE FILMS>, <CHITOSAN>, <ANTIOXIDANT ACTIVITY>, <PHYSICAL PROPERTIES>, <ÑACHAK (*Bidens andicola*)>.

INTRODUCCIÓN

El consumismo actual de la humanidad relacionado con el avance tecnológico ha traído efectos negativos, entre los principales problemas se encuentra la acumulación de basura procedente de diferentes partes del mundo, siendo el plástico, el desecho con mayor tiempo de degradación. (Niño 1996a: pp. 3-5.)

En Ecuador en el año 2014 se estima que se produjo unas 3.600 toneladas de basura, en Quito 1.800 y en Guayaquil 900 toneladas diarias de basura. Según reportes del INEC aproximadamente el 35% de basura son plásticos. Entre estos desechos inorgánicos tenemos además del plástico el tetrapak (polietileno, cartón y aluminio), papel, cartón, vidrio, aluminio y lata. En la actualidad debido a las tendencias de mercado los productos alimenticios usan envasados de plásticos que debido a su menor precio han sustituido al vidrio y al cartón. («Instituto Nacional de Estadística y Censos: Modulo Ambiental de Hogares» 2014a)

Los plásticos como desecho representan un problema ambiental en varios ecosistemas como suelos, océanos y lagos. Existen reportes de daño y muerte provocados a animales como aves, peces y mamíferos marinos donde un gran porcentaje de estos presentan pedazos de plástico en su estómago. Tanto los animales como el planeta no pueden digerir el plástico y según el tipo este puede tardar hasta 1.000 años en descomponerse en el medio ambiente por lo que el uso masivo resulta una catástrofe para la humanidad y el planeta. (Jambeck et al. 2015a)

Por otro lado, en la actualidad hay una gran demanda de elaborar productos inocuos libres de químicos y de gran valor nutricional. Debido a esto el uso de bioplásticos en el empaque de alimentos surge como alternativa para mantener los alimentos frescos por mayor tiempo y reemplaza el uso de materiales termoplásticos que generan grandes problemas al ambiente. (Vodnar et al. 2015)

Entre varios polisacáridos el quitosano obtenido del exoesqueleto de los crustáceos (el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza) presenta propiedades no-tóxicas, biodegradables, biocompatibles, antimicrobianas y su capacidad formadora de películas ha sido ampliamente usada para la fabricación de bioplásticos para empaque de alimentos. (Aider 2010a)

El quitosano es un polisacárido natural derivado de la desacetilación de la quitina, el mayor componente del caparazón de crustáceos como cangrejo, camarón o langostino. (Nam et al. 2010) Debido a las múltiples funcionalidades del quitosano como biocompatibilidad, propiedades antimicrobianas, viscosidad, mucoadhesividad, capacidad quelante de metales y formador de películas entre otras hacen que el quitosano sea de gran importancia en alimentos, medio ambiente

e industrias biomédicas. (Shukla et al. 2013) Sin embargo, el quitosano sufre de algunas desventajas y requiere de más desarrollo para alcanzar los resultados específicos y la eficiencia necesaria. El enriquecimiento de diferentes compuestos en el quitosano no solo aumenta las propiedades deseadas, sino también amplía el campo de aplicaciones potenciales del quitosano. (Shukla et al. 2013a)

La fabricación y uso de plásticos biodegradables a base de quitosano tendrían un beneficioso impacto ambiental para disminuir los problemas de contaminación y toxicidad causados por el plástico. “Se estima que los plásticos recalcitrantes se acumulan en el medio ambiente a una velocidad de 25 millones de toneladas por año y aunque no se conoce el tiempo requerido por estos compuestos para su total mineralización a CO₂, se supone que el uso de plásticos biodegradables disminuiría la contaminación por estos productos en un 20%.” (Niño 1996b; pp. 4-6.)

Sobre este último punto las investigaciones sobre plásticos biodegradables se han dirigido a la introducción de nuevos compuestos que den nuevas propiedades y que no sean dañinos al medio ambiente; tanto los compuestos fenólicos y flavonoides son conocidos por poseer una potente propiedad antioxidante principalmente debido a su capacidad de captación de radicales libre. Es por eso que la introducción de estos metabolitos secundarios a la estructura de los bioplásticos de quitosano nos permite obtener nuevas matrices con satisfactorias propiedades antioxidantes y de extender las propiedades funcionales de los bioplásticos a base de quitosano. (Wang et al. 2013a)

Si logramos disminuir el uso de plásticos, los municipios podrían tener la capacidad adicional para manejar otro tipo de desechos. Además, los residuos obtenidos de crustáceos se los puede usar para la obtención de quitina, compuesto útil para la elaboración de plásticos biodegradables, el aprovechamiento de este tipo de productos que antes se desechaban permitiría la creación de nuevas fuentes de empleo.

Los compuestos fenólicos están ampliamente dispersos en todo el reino vegetal representando aproximadamente 8000 estructuras fenólicas diferentes. Estos compuestos son sintetizados por las plantas durante su desarrollo y en respuesta a condiciones como infecciones, heridas, radiación UV, etc. (Stalikas 2007); la gran ventaja de conjugar compuestos fenólicos en el quitosano sería añadir propiedades como antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas o propiedades antitumorales (Curcio et al. 2009), lo que permitiría la fabricación agentes encapsulantes o la elaboración de materiales para el empaque de comida con una amplia cantidad de aplicaciones en el área de alimentos, farmacia e industrias ambientales. (Wang et al. 2013b)

Las aplicaciones generales de la quitina y el quitosano: derivados solubles de quitina, tales como la carboximetilquitina tiene propiedad de retener agua y se proyectan para usarse en acondicionadores para cabello u otros cosméticos. Oligosacáridos de quitina, como quitopentosas y quitohexosas, se ha reportado que tienen un efecto inmunoestimulante. El quitosano también tiene propiedades para retener agua, en base a esta propiedad, se ha creado ropa deportiva que absorba fácilmente el sudor. Efectos antibacterianos del quitosano son bien conocidos, además de propiedades hipercolesterolemicas y a nivel vegetal acelera el crecimiento. También se han elaborado membranas de quitosano por su capacidad para separar soluciones de alcohol-agua, utilizadas en la industria química. (Hirano 1996a)

La quitina no se disuelve en la mayoría de los solventes orgánicos como agua y alcohol. Está usualmente unida a proteínas. En 1859, un químico llamado Rouget encontró que calentando quitina en presencia de hidróxido de sodio concentrado la convierte a un compuesto relacionado pero más útil llamado quitosano. Uno de los primeros usos de la quitina fue purificar agua obtenida del procesamiento de la industria pesquera, específicamente de mariscos. Estas plantas producen además del agua sólidos como carapachos y vísceras. Cerca del 85% del peso de cada animal es desechado, lo que origina cerca de 3 millones de toneladas de desechos sólidos cada año. Algunas de estas compañías usan la quitina derivada de sus desechos sólidos para purificar su agua. Un estudio en una planta ubicada en Louisiana en 1989, mostró que el quitosano obtenido de sus desperdicios pudo remover 98% de los sólidos suspendidos en el agua de desecho. La quitina y el quitosano son de hecho buenos agentes quelantes. Una industria Japonesa llamada Kuríta vende el quitosano como un agente floculante. En Japón al menos 5 compañías fabrican quitina y quitosano a partir de carapacho de cangrejo. Chito-Bios de Ancona, Italia vende quitosan-N-caiboxibutil, bajo el nombre de EvalsamR, para shampoos, jabones para baño, jabones líquidos, pasta de dientes, etc. (Niño 1996c: pp. 4-6.)

Varios países, incluyendo EUA, Japón, Noruega, Italia e India, tienen actualmente plantas productoras de quitina/quitosano a partir de moluscos. Lo poco que producen es usado para industria farmacéutica y para tratamiento de aguas residuales. No existen datos acerca de cuanta quitina teóricamente es disponible de la industria de crustáceos, pero de acuerdo a la FAO, a nivel mundial serían 3.69 millones de toneladas de crustáceos y asumiendo que 1% del peso del crustáceo es quitina, asumimos 36 700 toneladas por año de quitina como desecho del procesamiento de camarón, langosta, cangrejo. El principal problema es que no es costoso económicamente hablando, el coleccionar estos desperdicios de varias compañías procesadoras pequeñas. Al parecer la mayor fuente de quitina en el futuro podría ser por biotecnología más que a partir de desechos del mar. Si la demanda se incrementara, los fabricantes podrían desarrollar microorganismos modificados genéticamente para producir estos compuestos. Ciertas algas

producen quitina en forma de fibras extracelulares, que podrían ser del 10 al 13% de su peso seco. El quitosano puede producirse en muchas presentaciones: polvo, pasta, solución, membranas, fibras. (Niño 1996d: pp. 23-25.)

Un estudio sobre la permeabilidad de membranas elaboradas a partir de quitina hacia el agua y solutos, encuentra que las membranas elaboradas pueden ser potencialmente utilizadas como membranas de osmosis inversa o en otras aplicaciones que requieran la separación de agua y solutos. (Rutherford, Frank. Dunson 1984a)

Una amplia variedad de microorganismos en suelo y agua son capaces de degradar quitina y quitosano. Algunos degradan solamente el quitosano mientras que otros degradan ambos polisacáridos. Los microorganismos degradadores de quitina son extremadamente comunes en suelo (10^5 UFC por g de suelo de jardín, bosque, y muestras de suelos agrícolas). (Toffey y Glasser 2001)

La formación de membranas y fibras a partir de quitosano es dependiente de la estructura del quitosano que se utilice y este va a depender de la especie de crustáceo de la cual se obtenga. Así, utilizando quitosano obtenido a partir de diversos crustáceos se obtuvo membranas flexibles y resistentes, con una fuerza de tensión de 20,000 psi y un porcentaje de elongación de 6%, a través de la técnica de moldeado, las cuales se desintegraron completamente en 3 a 4 semanas en el Atlántico Norte en las costas de Massachusetts. (Rutherford, Frank. Dunson 1984b)

Actualmente las compañías procesadoras de alimentos del mar consideran sus subproductos como basura y los apilan en las líneas costeras alrededor del mundo por millones de toneladas. Sin embargo, en años recientes debido al incremento en salvaguardar el medio ambiente, una nueva generación de investigadores en Estados Unidos han considerado a la quitina y el quitosano como compuestos potenciales debido a que no son tóxicos y son biodegradables. (Hirano 1996b)

La biodegradabilidad de la quitina es importante desde el punto de vista técnico, especialmente en relación a su uso como acarreador para drogas de liberación lenta, plaguicidas, y otras formulaciones. La bacteria *Serratia marsecens* y *Enterobacter liquefaciens* son 10 veces tan activas para degradar quitina como *Aspergillus fumigatus* y *Streptomyces*. La producción de quitina y quitosano está basada en aprovechar los residuos del caparazón de langosta y cangrejo de industrias ubicadas en Oregon, Washington, Virginia y Japón. Muchos países tienen grandes fuentes de crustáceos sin explotar como Noruega, México y Chile. Para producir 1 Kg de quitosano 70% deacetilado, a partir de caparazón de camarón se requieren 6.3 Kg de HCl al 30% y 1.8 Kg de NH₄OH. Actualmente el precio del quitosano a nivel mundial es de \$ 15.00/Kg. La

quitina y el quitosano tienen baja toxicidad, la LD50 del quitosano en ratones de laboratorio es de 16 g/Kg de peso, cercana a la de sal y azúcar. (Hirano 1996c)

El quitosano ha sido investigado para elaborar membranas plásticas biodegradables, en los diferentes estudios se ha usado diversos tipos de sustancias que le brinden un valor agregado; sin embargo, no existen datos con plantas endémicas del Ecuador, por lo que la presente investigación busca agregar fenoles y flavonoides totales de *Bidens andicola* para mejorar la capacidad antioxidante de los bioplásticos donde se propone su uso para el empaque de alimentos como productos cárnicos o frutas y vegetales por ejemplo. Por lo tanto el aporte del presente trabajo radica en la integración de fenoles y flavonoides totales de *Bidens andicola* a los bioplásticos, debido a la riqueza en derivados fenólicos que presenta la especie.

La planta Ñachak (*Bidens andicola*) es una especie vegetal nativa de Ecuador, Perú y Argentina (Hilgert 2001a)(Rehecho et al. 2011a). Esta planta pertenece a la familia Asteraceae y es una hierba perenne (De-la-Cruz, Vilcapoma y Zevallos 2007). Un estudio etnobotánico peruano e investigación argentina determinaron que *B. andicola* puede usarse contra varios trastornos (Hilgert 2001b) (Rehecho et al. 2011b). En relación con la composición química de *B. andicola*, se han identificado compuestos derivados de quercetina 3-O-metil éter, chalconas y quercetina, especialmente compuestos de tipo glucósido (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998a). La quercetina 3-O-metil éter es un flavonoide con propiedades antioxidantes, anticancerígenas y antiinflamatorias comprobadas en varios modelos celulares (Li et al. 2012) (Tseng et al. 2012). Este recurso vegetal es ampliamente utilizado por las comunidades indígenas de Ecuador como colorante, antigripal, tónico y refrescante (Vinueza et al. 2017a).

El objetivo de la presente investigación es la elaboración de bioplásticos a base de quitosano enriquecidos con fenoles/flavonoides provenientes del extracto concentrado de *Bidens andicola*, para comprobar su capacidad antioxidante, se realizó un control de calidad de las características del plástico formado, se elaboró diferentes formulaciones en el laboratorio de productos naturales de la ESPOCH en la Facultad de Ciencias con el propósito de obtener un potencial reemplazo a los plásticos usados en empaque de alimentos y darle un valor agregado aumentando la estabilidad de los mismos.

OBJETIVOS.

Objetivo General.

Determinar si existen diferencias en el potencial antioxidante de los bioplásticos a base de quitosano por causa de la aplicación de un extracto hidroalcohólico concentrado de *Bidens andicola*.

Objetivos Específicos.

- Determinar la calidad y composición Fitoquímica de la droga vegetal seca, obtenida a partir de las partes aéreas de *Bidens andicola* mediante los ensayos de control de calidad y tamizaje fitoquímico.
- Elaborar un bioplástico (film) basado en quitosano enriquecido con un extracto hidroalcohólico concentrado de *Bidens andicola* a diferentes concentraciones para brindarle una actividad antioxidante.
- Investigar las potenciales interacciones entre quitosano y los fenoles/flavonoides del extracto de *Bidens andicola* en el bioplástico mediante espectroscopia infrarroja.
- Caracterizar la densidad, contenido de humedad, opacidad, solubilidad y permeabilidad al vapor de agua del bioplástico mediante pruebas fisicoquímicas.
- Cuantificar el contenido de flavonoides y fenoles totales presentes en el bioplástico mediante métodos colorimétricos.
- Evaluar la actividad antioxidante del bioplástico mediante el análisis de la captación del radical libre DPPH´.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Plásticos

El plástico es un material que se produce de un polímero (fabricado del petróleo) que generalmente se hace fluir a presiones bajas para formarlo. Las características del plástico es que son ligeros e inertes químicamente con una gran ventaja de poder fabricarlos con mayor dureza, flexibilidad y hasta impermeables ganando excelentes características. Debido a esto el plástico ha reemplazado al papel, vidrio y metal en varias áreas, además que el plástico posee una larga vida útil y es resistente a la degradación en el medio ambiente. (Breslin 1993)

1.1.1 Problemática de los plásticos

Un mundo sin plásticos, o polímeros orgánicos sintéticos, parece inimaginable hoy en día, sin embargo, su producción y uso a gran escala data de ~ 1950. Aunque los primeros plásticos sintéticos, como la baquelita, aparecieron a principios del siglo XX, el uso generalizado de plásticos fuera de las fuerzas armadas no se produjo hasta después de la Segunda Guerra Mundial. El rápido crecimiento resultante en la producción de plásticos es extraordinario, superando a la mayoría de los demás materiales hechos por el hombre. Excepciones notables son los materiales que se utilizan ampliamente en el sector de la construcción, como el acero y el cemento. (Geyer, Jambeck y Law 2017)

En cambio, el mercado más grande de plásticos es el envasado, una aplicación cuyo crecimiento se aceleró por un cambio global de contenedores reutilizables a contenedores de un solo uso. Como resultado, la participación de los plásticos en los desechos sólidos municipales (en masa) aumentó de menos del 1% en 1960 a más del 10% en 2005 en los países de ingresos medianos y altos. (Jambeck et al. 2015) Al mismo tiempo, la generación de desechos sólidos a nivel mundial, que está fuertemente correlacionada con el ingreso nacional bruto per cápita, ha crecido de manera constante durante las últimas cinco décadas. (D. Hoornweg, P. Bhada-Tata 2013)

El mayor problema de los plástico es su rápida acumulación en el medio ambiente, se aproxima que tiene una velocidad de 25 millones de toneladas al año y según reportes ninguno de estos plásticos sufren modificaciones hasta 20 años después gracias a su estabilidad química, gran peso

molecular y un radio bajo de superficie que los hace casi inmunes al ataque de microorganismos. (Niño 1996e)

La gran mayoría de los monómeros utilizados para fabricar plásticos, como el etileno y el propileno, se derivan de hidrocarburos fósiles. Ninguno de los plásticos comúnmente usados son biodegradables. Como resultado, se acumulan, en lugar de descomponerse, en los vertederos o en el entorno natural. (Barnes et al. 2009)

La única forma de eliminar permanentemente los desechos plásticos es mediante un tratamiento térmico destructivo, como la combustión o la pirólisis. Por lo tanto, la contaminación casi permanente del medio ambiente con desechos plásticos es una preocupación creciente. Se han encontrado desechos plásticos en todas las principales cuencas oceánicas (Barnes et al. 2009), con un estimado de 4 a 12 millones de toneladas métricas (Mt) de desechos plásticos generados en tierra que ingresa al medio marino en 2010 solamente. (Jambeck et al. 2015b)

En Ecuador en el año 2014 se estima que se produjo unas 3.600 toneladas de basura, en Quito 1.800 y en Guayaquil 900 toneladas diarias de basura. Según reportes del INEC aproximadamente el 35% de basura son plásticos. Entre estos desechos inorgánicos tenemos además del plástico el tetrapak (polietileno, cartón y aluminio), papel, cartón, vidrio, aluminio y lata. En la actualidad debido a las tendencias de mercado los productos alimenticios usan envasados de plásticos que debido a su menor precio han sustituido al vidrio y al cartón. («Instituto Nacional de Estadística y Censos: Modulo Ambiental de Hogares» 2014)

1.1.2 Plásticos biodegradables

Son aquellos plásticos que han sufrido un cambio en su estructura química bajo condiciones específicas dando como resultado la pérdida de algunas de sus propiedades o en otra definición dice que son aquellos plásticos que tienen la capacidad de ser degradados por la acciones de microorganismos que se encuentran en el medio ambiente, que su degradación se produce por la acción de la luz solar o que pueden ser degradados por hidrólisis. (Narayan 1991)

“El plástico biodegradable está fabricado con materias primas orgánicas que proceden de fuentes renovables, como por ejemplo el plátano, la yuca, la celulosa, las legumbres que contienen grandes cantidades de ácido láctico, los polisacáridos, polilactonas, poliláctidos, el aceite de soja, la fécula de patata que al final de su vida útil, al ser eliminado como residuo orgánico, este se descompone en un corto período de tiempo, en presencia de microorganismos; sirviendo de abono orgánico para las plantas.” (Niño 1996f)

El plástico actualmente se encuentra en varios ecosistemas de la vida silvestre, tanto en tierra como en el océano, esto ha provocado que los ambientalistas busquen nuevas soluciones para reemplazar al plástico o disminuir su contaminación ambiental. El reciclaje, incineración y la degradación inducida como la fotodegradación, biodegradación o ataque por microorganismos son algunas de las opciones.

La biodegradación puede producirse por el ataque de microorganismos como hongos o bacterias y por vía enzimática dando como resultado la pérdida de estructura del plástico y decreciendo su peso molecular.

La primera generación de compuestos degradables al medio ambiente fue la mezcla de polímeros naturales como el almidón, más adelante se centraría en la conjugación de grupos funcionales como enlaces de éster sobre la estructura polimérica ya que estos enlaces los hacían susceptibles al ataque microbiano. Un mayor avance se dio en el desarrollo del Polihidroxitirato (PHB) que es naturalmente sintetizado por bacterias en biorreactores y son biodegradables.

Existen 4 clases principales de plásticos biodegradables según su estado de desarrollo:

- 1) Mezclas de polímeros naturales con aditivos que son consumidos por microorganismos. Ej. Mezclas de almidón con polietileno para fabricar bolsas biodegradables. (Otey y Westhoft 1984)
- 2) Polímeros sintéticos con grupos vulnerables al ataque por hidrólisis. Ej. La proliprolactona, fibras de poliadipato de tetrametileno, copolímeros de polietilensuccinato y polietilenglicol, y copolímero de politetrametilglicol y polietilensuccinato. Además copolímeros biodegradables de ácido láctico han sido sintetizados para uso marítimo y biomédico. (Lee et al. 1991)
- 3) Polímeros producidos a partir de bacterias que se denominan Polihidroxialcanoatos (PHA). Estos se pueden procesar para formar plásticos biodegradables, tienen una gran ventaja de rápida degradación al ambiente comparada con los plásticos sintéticos debido a que varios hongos y bacterias en el ambiente los pueden usar como alimento, además poseen propiedades fisicoquímicas similares a los plásticos sintéticos. («Plásticos biodegradables o bioplásticos» 2007a)
- 4) Plásticos a partir de plantas modificadas genéticamente (Biofactorías), estos se generan introduciendo genes de bacterias que contienen información para fabricar PHA a plantas mediante la ingeniería genética. Produciendo grandes cantidades a partir de los propios nutrientes que la planta consume como almidón y ácidos grasos, lo que reduciría los costos de producción. («Plásticos biodegradables o bioplásticos» 2007b)

Para que exista la degradación en el medio ambiente deben existir ciertos requisitos:

- Que existan microorganismo como bacterias, hongos, etc.
- La presencia de oxígeno, humedad y nutrientes minerales.
- Una temperatura entre 20 a 60° C dependiendo el tipo de microorganismo.
- Un pH de 5 a 8.

1.1.3 Aplicaciones de plásticos biodegradables

Los plásticos biodegradables tienen numerosas aplicaciones desde el ámbito medico como implantes para cirugía o de soportes para drogas de liberación prolongada hasta aplicaciones agrícolas como el acolchado además de las múltiples aplicaciones para el empaqueo de alimentos.

1.1.3.1 Aplicaciones Médicas

Dentro del campo medico los plásticos biodegradables han sido desarrollados como implantes quirúrgicos para usarlos dentro de cirugías como la vascular y ortopédica, para suturas quirúrgicas absorbibles y para uso oftálmico, dentro del área farmacéutica se han logrado elaborar matrices de implantes para drogas de liberación prolongada y lenta. (Struszczyk 2006a)

Dentro de las aplicaciones médicas la quitina y el quitosano son ampliamente utilizados para el diseño de nuevos dispositivos, aunque su aplicación industrial es muy rara. Estos biopolímeros tienen una gran gama de propiedades útiles:

- Son biocompatibles, antimicrobianos y amigables al medio ambiente.
- Se han diseñado como vendajes para heridas, especialmente para tratamientos de heridas crónicas.
- Agentes tópicos hemostáticos.
- Andamios para la regeneración de tejido natural (hueso, tejido conectivo, etc.)
- Sellado para prótesis vasculares porosas.
- Agente de control del colesterol en la sangre.
- Agentes antitumoral.
- Excipientes en la fabricación de medicamentos, etc.

Este biopolímero es bien conocido en la aplicación de heridas por sus propiedades hemostáticas. Además también muestra otras actividades biológicas y afecta la función de los macrófagos que ayudan a acelerar la cicatrización de las heridas, estimulan la proliferación celular y la organización del tejido. Las propiedades biológicas, incluidas las propiedades bacteriostáticas y

fungistáticas, son particularmente útiles para el tratamiento de heridas. (Struszczyk 2006b)

1.1.3.2 Aplicaciones Agrícolas

Una gran aplicación de plásticos biodegradables es en el área agrícola donde se pueden usar polímeros de formaldehído-urea en fertilizantes de liberación lenta, estos son usados para formular alimentos balanceados con finalidad de dar mayor estabilidad al granulo en agua e impedir su destrucción antes que consuma el animal. También existe un gran mercado para la fabricación de contenedores biodegradables para trasportar flores, vegetales y arbustos ornamentales. (Ramírez et al. 2010a)

La quitina y sus derivados son biológicamente activos durante su interacción con plantas y microorganismos (Hirano 1996d). Se han identificado cuatro enfoques principales para la aplicación de quitina en la agricultura:

- 1) Protección de plantas contra plagas y enfermedades antes y después de la cosecha.
- 2) Mejora de la acción de los microorganismos antagonistas y controles biológicos, mejorando las interacciones beneficiosas
- 3) Relaciones simbióticas planta-microorganismo
- 4) Regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas. (Ramírez et al. 2010b)

Por ejemplo en un estudio donde se desarrollaron mezclas de quitosano con aloe vera para la preservación de la papa criolla se obtuvo como resultados que *“la caracterización de las películas sugieren la incorporación de un 20% del gel Aloe vera en mezclas de quitosano al 2.5% p/v, debido a que presenta una aceptable homogeneidad, la aplicación de recubrimiento a base de quitosano y Aloe vera en papa criolla permite conservar el contenido de carotenoides totales hasta en un 70% en comparación con las muestras sin recubrimiento”*. (Guanca C et al. 2016)

1.1.3.3 Aplicaciones para plásticos para empaque

Debido al gran uso de plástico para productos desechables el reemplazo por plásticos biodegradables ha cobrado interés actualmente. Existen mezclas de polietileno con almidón que han tenido éxito, y actualmente se estudian la formación de plásticos biodegradables a partir de diferentes polisacáridos como quitina, pectina, celulosa, etc. Estos plásticos biodegradables tendrían uso para empaque e incluso como el uso de membranas. (Niño 1996g)

La industria alimenticia moderna está enfrentando diferentes desafíos, uno de estos es el empaque

de productos alimenticios debido a que los empaques de plástico convencionales poseen una corta vida de estantería. Aunque el uso de estos plásticos y sus derivados son efectivos para preservar los alimentos estos crean un serio problema ambiental que continua presente en la industria alimentaria como fuente de contaminación y de preocupación social. (Aider 2010b)

Uno de los aspectos fundamentales en este problema es el costo del producto final que está relacionado con el tipo de empaque que lleve el producto. Entonces la búsqueda de empaques de alimentos más económicos es un aspecto muy importante para la industria. (Aider 2010c)

Los plásticos biodegradables han sido investigados por su habilidad de evitar la humedad o absorción de agua, la entrada de oxígeno al alimento, la pérdida de aroma y el transporte de sustancias. Es por eso que el uso de plásticos biodegradables es una de las maneras más prometedoras para elaborar empaques como método para preservar la calidad del alimento. (Aider 2010d)

Uno de los mejores avances en films ha sido los basados en quitosano combinados con diferentes sustancias como plantas o proteínas animales.

1.2 Quitina y quitosano

La quitina tiene una alta tasa de regeneración, con estimaciones anuales de al menos 1 x 10⁹ toneladas que se sintetizan y degradan cada año en la naturaleza. Esta sustancia se encuentra en estructuras celulares de hongos, bacterias, insectos, arácnidos, crustáceos, nematodos y otros invertebrados como anélidos, moluscos, cefalópodos y hemicordados (Wu, Wu y Chen 2003).

La quitina es un sólido blanco, parcialmente cristalino, inodoro e insípido en su estado puro. Está formado por unidades de aminosacáridos de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa, unidos por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4) para formar una cadena lineal, algunos de los cuales aparecen desacetilados. Por lo tanto, la quitina muestra una estructura que se asemeja a la celulosa, a excepción del residuo de carbono en la posición 2 que tiene un grupo acetamida unido a la quitina en lugar del grupo hidroxilo de la celulosa (Peniche Covas, Argüelles-Monal y Goycoolea 2008a)

El quitosano es un polisacárido lineal que consiste de (1,4)-2-amino-deoxy-b-d-glucano que se obtiene por la desacetilación de la quitina, la quitina es el segundo aminoácido más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Gómez-Ríos, Barrera-Zapata y Ríos-Esteva 2017); es no tóxico, biodegradable, biofuncional, biocompatible y ha sido reportado por varios investigadores de tener una fuerte actividad antimicrobiana (Darmadji y Izumimoto 1994); el quitosano ha sido ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica (Peniche Covas; et al. 2008b)

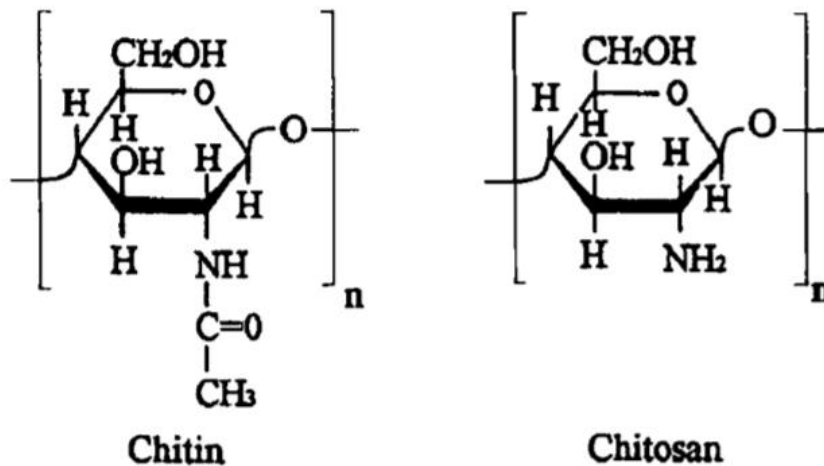


Figura 1-1. Estructura química de la quitina y quitosano
 FUENTE: (Hirano 1996)

1.2.1 La fabricación de quitina y quitosano

La quitina y el quitosano se fabrican comercialmente por un método químico. Las cáscaras de cangrejo o camarones se desprotonizan por tratamiento con una solución acuosa de NaOH al 3-5% a temperatura ambiente durante la noche o a 80-90°C durante algunas horas. El producto resultante se desmineraliza por tratamiento con una solución acuosa al 3-5% de HCl a temperatura ambiente para proporcionar una muestra blanca o ligeramente rosada de quitina. (Hirano 1996e)

La N-desacetilación de la quitina se realiza por tratamiento con una solución acuosa de NaOH al 4 y 45% a 90-120 ° C durante 4-5 h, y el precipitado insoluble se lava a fondo con agua para proporcionar una muestra bruta de quitosano. La muestra cruda se disuelve en ácido acético acuoso al 2% y se elimina el material insoluble. La solución clara sobrenadante resultante se neutraliza con una solución acuosa de NaOH para proporcionar una muestra purificada de quitosano como un precipitado blanco. (Hirano 1996f)

El método químico consume mucha energía y desperdicia una gran cantidad de solución alcalina concentrada, lo que resulta en una contaminación del medio ambiente. El método será reemplazado en el futuro con un método enzimático. Las cáscaras de cangrejo o camarones son tratadas por proteasas en condiciones ácidas para la eliminación de ambas proteínas y CaCO₃, al mismo tiempo para proporcionar quitina, y el tratamiento sucesivo con quitina-N-desacetilasa para la eliminación del grupo N-acetilo da quitosano. (Peniche Covas, Argüelles-Monal y Goycoolea 2008c)

1.2.2 Características moleculares de quitina y quitosano:

- Es el componente principal de las conchas de cangrejo y camarones, que se abandonan de las empresas de procesamiento de productos marinos.
- Son amino-polisacáridos raros de ocurrencia natural.
- Son biológicamente reproducibles en la tierra.
- Son biodegradables en el medio ambiente.
- Son biocompatibles con órganos, tejidos y células de animales y plantas.
- Es casi no tóxica en administraciones orales e implantes en animales.
- Tienen la capacidad de ser procesados en varios productos de fundición incluyendo escamas, polvos, perlas, membranas, esponjas, algodones, fibras y geles.
- Tiene propiedades de alta viscosidad, humectante, quelante de metales, formador de poli electrolitos, unión de afinidad, etc.
- Funcionales biológicamente en los órganos, tejidos y células de animales, plantas y en suelo e hidrosferas.
- Modificable químicamente y enzimáticamente. (Hirano 1996g)

La quitina es casi no tóxica, el LD50 para el quitosano es de 16 g / kg en ratones. (Ramírez et al. 2010c); una amplia variedad de microorganismos en suelo y agua son capaces de degradar quitina y quitosano. Algunos degradan solamente el quitosano mientras que otros degradan ambos polisacáridos. Los microorganismos degradadores de quitina son extremadamente comunes en suelo (10^5 UFC por g de suelo de jardín, bosque, y muestras de suelos agrícolas). (Toffey y Glasser 2001)

1.2.3 Actividad antimicrobiana

Varios estudios han mostrado que una de las características del quitosano es la actividad antimicrobiana que posee ante un gran rango de microorganismos. La actividad antimicrobiana del quitosano varía dependiendo el tipo, particularmente del grado de desacetilacion, peso molecular y las condiciones del medio al que es aplicado el quitosano donde afecta especialmente el pH, fuerza de los iones y la presencia de solutos que puedan interaccionar químicamente con el quitosano.

Su mecanismo antimicrobiano ha sido estudiado, como teoría, se sugiere que las cargas positivas de los grupos amino (NH_3) a valores de pH menores que el pka ($\text{pH} < 6.3$) en la que este grupo funcional lleva el 50% de su carga eléctrica total que permite las interacciones con las membranas de las células microbianas cargadas negativamente, un fenómeno que es susceptible a provocar

una fuga de constituyentes intracelulares. (Jo et al. 2001)

1.2.4 Películas activas (films) basados en quitosano

En la industria alimenticia, las películas y los revestimientos biológicos activos comestibles ofrecen muchas ventajas debido a su comestibilidad, biocompatibilidad con tejidos humanos, aspecto estético, propiedades de barrera contra microorganismos patógenos, no toxicidad, no contaminantes y de bajo costo (Coma 2008); por estas razones, han atraído una atención particular y se han considerado en la conservación de alimentos debido a su capacidad para ser utilizados como materiales de revestimiento de alimentos para extender la vida útil de diferentes productos alimenticios. (Majid et al. 2016)

Teniendo en cuenta la tendencia de salud de la tecnología moderna de alimentos, el uso de películas activas de base biológica como materiales de embalaje es muy importante. Entre los biopolímeros conocidos, el quitosano parece ser muy prometedor como aditivo para la preparación de películas activas de base biológica. (Aider 2010e)

Esto se debe principalmente a su carácter catiónico único y propiedades versátiles. Varios investigadores reconocen que un embalaje con actividad antimicrobiana es muy prometedor para la mejora de calidad y preservación de los alimentos durante el procesamiento y almacenamiento de diferentes materiales alimenticios. Por lo tanto, el envasado activo a base de quitosano puede ser útil para preservar y extender la vida útil de alimentos. Además, el quitosano se reconoce como no tóxico y, por lo tanto, puede ser consumido junto con la comida conservada. Sin embargo, considerando el costo de la preparación de quitosano, parece importante combinarlo con otras películas formando biopolímeros mejorados con compuestos de plantas, proteína animal así como otros polisacáridos. (Aider 2010f)

También es necesario mejorar las propiedades mecánicas, la permeabilidad al vapor de agua y la capacidad de permeación al gas así como de darle nuevas funcionalidades como poder antioxidante. El hallazgo de tecnologías de bajo costo para la preparación de películas activas basadas en quitosano es una clave para el éxito de este biopolímero único como un material de embalaje real. (Aider 2010g)

Entre algunas de las investigaciones que se han realizado tenemos:

- El ácido gálico conjugado con quitosano no solo aporta una actividad antioxidante pero también mejora la solubilidad en agua del quitosano. Al incorporar ácido gálico en quitosano

- este realiza funciones múltiples y muestra propiedades únicas. (Pasanphan y Chirachanchai 2008)
- Películas de quitosano preparadas usando diferentes los plastificantes mostraron varias características interesantes, la resistencia a la tracción de las películas de mezcla disminuyó mientras que elongación aumento. Las películas de sorbitol fueron más flexibles en comparación a otras películas plastificadas, mientras que las películas de PEG eran menos flexibles. La adición de ácidos grasos no influyó en las propiedades mecánicas de las películas. (Srinivasa, Ramesh y Tharanathan 2007)
 - Aceite de canela conjugado con quitosano mejoro la capacidad antimicrobiana del film. (Wang et al. 2011)
 - Al conjugar ácido protocatecuico con quitosano se exhibió mayor poder reductor antioxidante y una mejor capacidad de eliminación de radicales DPPH. (Liu et al. 2016)
 - Quercetina conjugada con quitosano mostró una mejora de sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y de degradación térmica. Además la quercetina le dio una plasticidad potenciada. (Beltran y Sandoval 2017)
 - La incorporación de polifenoles de té (TP) en el quitosano mostro una influencia considerable en las propiedades fisicoquímicas de las películas de quitosano / TP obtenidas. La incorporación de TP causó interacciones entre el quitosano y TP dando lugar a una apariencia más oscura de las películas de quitosano / TP. La permeabilidad al vapor de agua de la película de quitosano se redujo y la actividad antioxidante de la película de quitosano se incrementó significativamente después de la adición de TP, las películas de quitosano / TP no solo tienen mejor capacidad de obstaculizar la transmisión de la humedad, pero también poseen una resistencia a la oxidación mejorada, lo que hace que las películas de quitosano / TP muestren un gran potencial para ser utilizados en el envasado de alimentos activos. (Wang et al. 2013c)

1.3 *Bidens andicola*.

Bidens andicola es una especie vegetal nativa de Ecuador, Perú y Argentina (Hilgert 2001)(Rehecho et al. 2011). Esta planta pertenece a la familia Asteraceae y es una hierba perenne (De-la-Cruz, Vilcapoma y Zevallos 2007). Un estudio etnobotánico peruano e investigación argentina determinaron que *B. andicola* puede usarse contra varios trastornos (Hilgert 2001) (Rehecho et al. 2011). En relación con la composición química de *B. andicola*, se han identificado compuestos derivados de quercetina 3-O-metil éter y quercetina, especialmente compuestos de tipo glucósido (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998). La quercetina 3-O-metil éter es un flavonoide informado como antioxidante, anticancerígeno y antiinflamatorio en varios modelos celulares (Li et al. 2012) (Tseng et al. 2012). Este recurso vegetal es ampliamente utilizado por las comunidades indígenas de Ecuador como colorante, antigripal, tónico y refrescante (Vinueza et al. 2017).

Bidens andicola es una hierba que se encuentra ampliamente en la zona Andina, mide 30 cm de alto y tiene inflorescencias de 4 a 5 cm de diámetro, además florece durante los meses de octubre a julio a una altura de 2500 a 4500 msnm. Presenta un tallo delgado con ramificaciones con hojas opuestas, sus flores son marginales y amarillas. (Marín y Parra 2015)



Figura 2-1. Flor de *Bidens andicola*

Fuente: (Marin, C; & Parra 2015)

1.3.1 Usos

La seguridad de *B. andicola* garantizada por cientos de años de uso por parte de las comunidades indígenas de América del Sur como medicina y bebida tradicional (Solis, Cutipa y Delle Monache 1991a); así como las propiedades antioxidantes de su compuestos naturales la convierten en una alternativa interesante para el desarrollo potencial de aditivos en alimentos. (Borneo et al. 2009)

Sin embargo aún no existen estudios suficientes que prueben actividad farmacológica de *Bidens andicola* específicamente, aunque según estudios de etnobotánica esta hierba ha sido usada para tratar procesos inflamatorios de diversa índole, como: insolación, inflamación interna, fiebre, ardor de estómago, resfrío, colerina y diarrea de niños. (Solis, Cutipa y Delle Monache 1991b)

Tabla 1-1: Descripción botánica de *Bidens andicola*

Reino: Plantae	División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida	Orden: Asterales
Familia: Asteraceae	Subfamilia: Asteroideae
Tribu: Coreoideae	Género: <i>Bidens</i>
Epíteto Específico: <i>andicola</i>	Autor Epíteto Específico: Kunth
	Nombre vulgar: Nachag (Kichwa), nachak, sisa, ñachi, ñakachay, flor de ñachak.

Fuente: (Marin, C; & Parra 2015)

Realizado por: Alex Hernández

1.3.2 Composición, principios activos y actividad farmacológica relacionada.

Estudios realizados del tamizaje fitoquímico de las plantas del género *Bidens* han determinado algunos de los metabolitos presentes en estas plantas, donde se ha identificado gran cantidad de compuestos fenólicos los cuales le brindan varias propiedades. (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998; Tommasi y Pizza 1997b)

Los compuestos fenólicos determinados en *Bidens andicola* mediante métodos cromatográficos y espectrofotométricos han sido al grupo flavónico como taninos y flavonoides específicamente flavonoles 7-O-glicosidos que tienen quercetina y quercetina 3-metil éter como aglicona, con cadenas de azúcar formadas por tres o cuatro azúcares, incluidas la beta-Dglucopiranososa, alfa-L-rhamnopyranose, y beta-D-xilopiranososa. (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998c)

Glicósidos de éster de chalcona como chalcona 4'-O-β-D-(4''- acetil – 6''- p –coumaroyl) glucopiranosido, chalcona 4'-O-β-D-6'' acetilglucopiranosido, chalcona 4'-O-β-D-3'',6'' diacetilglucopiranosido y chalcona 4'-O-β-D-3'',4'',6'' triacetilglucopiranosido, y otros esteres de chalcona que poseen a la Okanina como aglicona. (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998d)

1.4 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal con más de 8000 estructuras fenólicas conocidas actualmente (Harbone 1980); se encuentran ampliamente distribuidos en frutas y

vegetales además de ser una de las clases más importantes de metabolitos secundarios de las plantas los fenoles son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y vegetales, en su mayoría derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina. (Porras y López 2009)

Los componentes fenólicos más ampliamente distribuidos en las plantas son los ácidos hidroxicinámicos - p-cumarina, cafeico y ácido ferúlico. Son productos del metabolismo secundario de las plantas y surgen biogénicamente de dos principales vías sintéticas: la vía del shikimato y la vía del acetato. Su reactividad se debe al carácter ácido de la función fenólica y al carácter nucleófilo del anillo de benceno. (Paixão et al. 2007a)

1.4.1 Estructura química y clasificación

Los compuestos fenólicos se dividen en 3 grupos importantes: flavonoides, ácidos fenólicos y polifenoles. Se pueden definir químicamente a los fenoles como sustancias que contienen un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo, incluyendo a otros grupos funcionales.

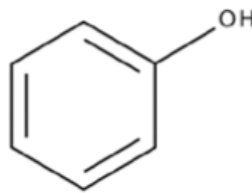


Figura 3-1. Estructura química del grupo fenol

Fuente: (Shahidi y Naczk 2006)

En el reino vegetal hay una gran cantidad de derivados fenólicos que incluyen los fenoles simples, fenilpropanoides, derivados del ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos, ligninas y fenoles unidos a una cadena larga de ácidos carboxílicos como componentes de la suberina y de la cutina; las plantas usan estos metabolitos secundarios para la reproducción y crecimiento, además poseen otras propiedades como protectoras de los rayos UV y aislantes en las paredes celulares. (Shahidi y Naczk 2006a)

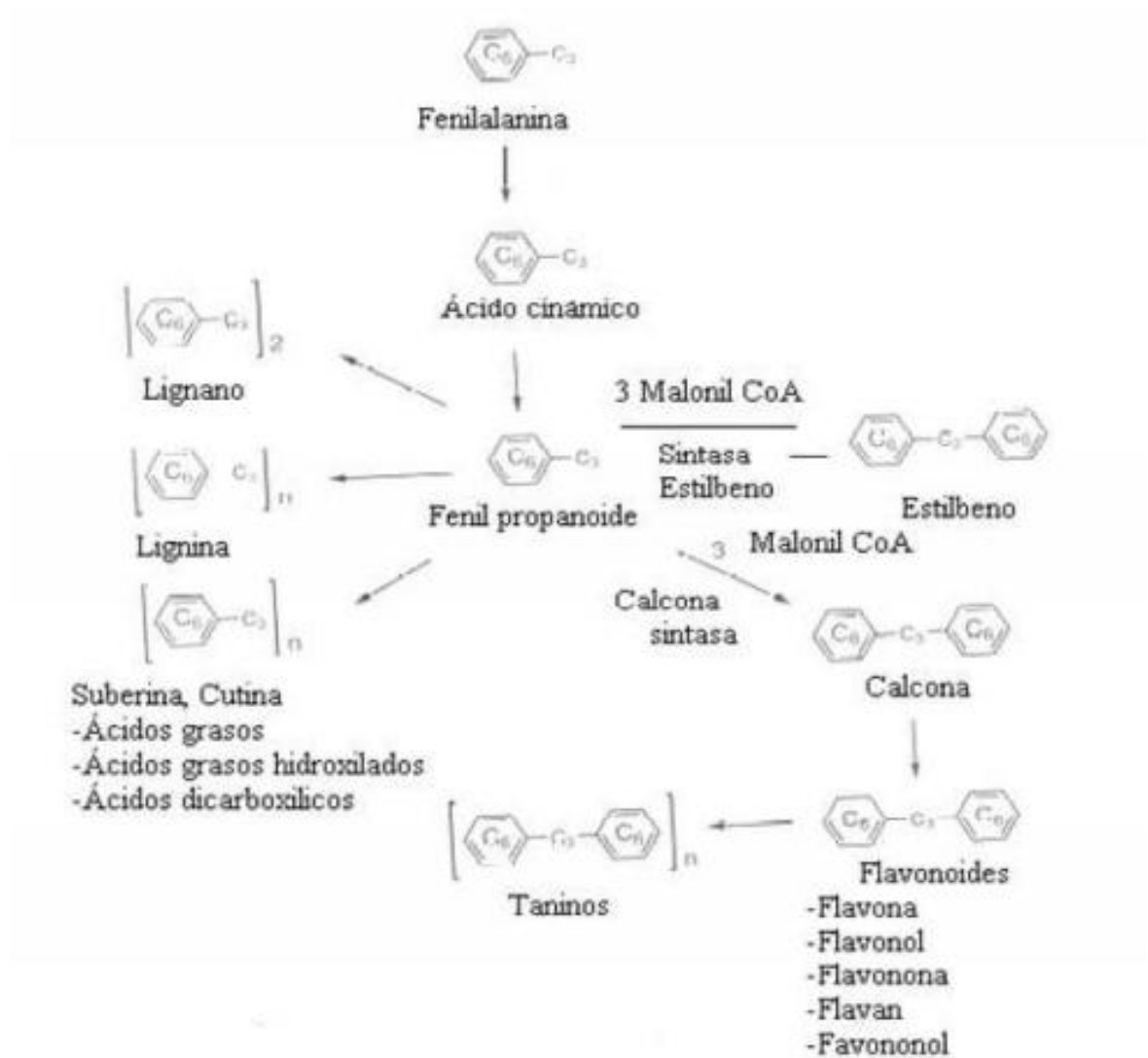


Figura 4-1. Producción de compuestos fenólicos

FUENTE: (Shahidi y Nacz 2006)

Otro grupo derivado de los fenoles son las antocianinas que se encuentran en frutas y tejidos de las plantas y son responsables del color azul, rojo, violeta y morado de casi todas las plantas, son utilizados como nutraceuticos en su forma seca y pulverizada y como colorantes en la industria alimenticia. (Shahidi y Nacz 2006b)

Tabla 2-1. Clasificación de los polifenoles y ejemplos de ellos

Estructura química	Tipo	Ejemplo de polifenol
C ₆	Fenol simple	Eugenol
C ₆ -C ₁	Ácido fenólico Ácido benzoico	Ácido gálico Ácido elágico
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolizables	
C ₆ -C ₂	Ácido fenil acético	
C ₆ -C ₃	Ácido hidroxicinámico Cumarinas	Ácido cafeico Ácido ferúlico
(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanos	
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas Xantonas	
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos	Resveratrol
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides Chalconas	Antocianinas Flavonoles Flavonas Flavanonas Isoflavonas Flavanoles
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Proantocianinas (taninos 4≤n≤11)	

Fuente: (García, Fernández y Fuentes 2015)

1.4.1.1 Fenoles simples, ácidos fenólicos y ácidos fenilacéticos

Existen fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resorcinol ampliamente distribuidos en las especies vegetales, los ácidos fenólicos como el gálico, vainillínico hidroxibenzoico, y los aldehídos como la vainillina también se encuentran en gran frecuencia en la naturaleza, en contrario existe poca información en literatura científica sobre los ácidos fenilacéticos en las plantas. Los ácidos fenólicos son los que generalmente presentan un poder antioxidante en las plantas. (Shahidi y Naczk 2006c)

1.4.1.2 Ácidos cinámicos, cumarinas e isocumarinas

Ácidos cinámicos como el cafeico, ferulico, p-cumarico y sináptico están raramente libres ya que generalmente se encuentran como derivados por ejemplo el ácido cafeico esta esterificado con el ácido quinico como ácido clorogenico, isoclorogenico, neoclorogenico, y criptoclotogenico mientras que las cumarinas y las isocumarinas se encuentran en forma de glicosido. Las cumarinas están ampliamente distribuidas en frutas y hortalizas por ejemplo la umbeliferona se ha encontrado que tiene una actividad antioxidante importante así como propiedades antibacterianas. (Shahidi y Naczk 2006d)

1.4.1.3 *Lignanos y neolignanos*

Otra clase de polifenoles biológicamente activos son los lignanos y neolignanos, su estructura química comprende un puente de cuarto carbono y de estos se forman más estructuras presentes en la naturaleza, son metabolitos de bajo peso molecular formado por acoplamiento oxidativo de unidades de hidroxifenilpropano que se unen por puentes de hidrogeno.

Están presentes en varios alimentos, como granos, hortalizas y uvas, los lignanos han demostrado una capacidad antioxidante significativa, y se consideran como fuentes de fitoestrógenos en la dieta. (Shahidi y Naczk 2006e)

1.4.1.4 *Taninos*

Los taninos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular comprendido entre 500 a 3000 Da (Daltons, unidad de masa atómica). Estos compuestos contienen un número importante de grupos hidroxilos entre otros grupos funcionales, siendo capaces de unirse a proteínas y otras macromoléculas, tienen la capacidad de precipitar algunas de las proteínas y alcaloides por lo que se usan para convertir la piel de los animales en cuero. (Shahidi y Naczk 2006f)

Este grupo de compuestos incluye constituyentes oligoméricos y poliméricos. Los taninos son polifenoles capaces de precipitar proteínas a partir de soluciones acuosas y están ampliamente distribuidos en las plantas. Se encuentran en cantidades especialmente altas en la corteza de ciertos árboles como el roble y en agallas. Los taninos también forman complejos con ciertos tipos de polisacáridos, ácidos nucleicos y alcaloides. (Shahidi y Naczk 2006g)

Dependiendo de sus estructuras, los taninos se definen como hidrolizables o condensados, el último término conocido también como proantocianidina. Los taninos condensados son oligómeros y polímeros de flavonoides, específicamente flavan-3-oles, mientras que los taninos hidrolizables son ácidos gálicos glucosilados. Muchos de estos ácidos gálicos están relacionados con moléculas de azúcar, en base a sus productos de hidrólisis, los taninos hidrolizables incluyen galotaninos y elagitaninos. (Shahidi y Naczk 2006h)

Los taninos condensados incluyen dímeros, oligómeros y polímeros de flavan-3-oles. Aproximadamente 50 procianidinas que van desde dímeros a hexámeros han sido identificados. Con base en el patrón de hidroxilación de los anillos A y B, las proantocianidinas se pueden dividir en procianidinas, propelargonidinas y prodelfinidinas. Las unidades consecutivas de taninos condensados se unen a través del enlace interflavonoide entre C-4 y C-8 o C-6. El peso

molecular de las proantocianidinas aisladas de las frutas varía entre 2000 y 4000 Da. (Shahidi y Naczk 2006i)

1.4.1.5 *Flavonoides y Chalconas*

Los flavonoides son metabolitos secundarios que se encuentra presentes en los vegetales como pigmentos, cuya función principal es proteger al organismo del daño que ocasionan las sustancias oxidantes o generadoras de radicales libres y también, los rayos ultravioleta. El cuerpo humano no puede sintetizar estas sustancias de forma natural; por lo cual, es necesario consumirlas en la ingesta diaria de alimentos y bebidas; aunque numerosos estudios indican que la acción farmacológica de la mayoría de los flavonoides se produce únicamente a elevadas dosis, comprobándose en la mayoría efectos antiinflamatorios, antivirales, antialérgicos y protectores contra enfermedades cardiovasculares y el cáncer. (Martínez-Flórez et al. 2002a)

Las chalconas, derivadas de productos naturales con estructura C6-C3-C6, tienen la característica de producir compuestos como los flavonoides, que cuentan con diversas actividades biológicas como antibacterianos, antifúngicos, anticancerígenos y antileishmaniasis, dependiendo de la sustitución aromática. (Elizabeth et al. 2012)

Los flavonoides y chalconas actúan como antioxidantes, y se definen como sustancias que, a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato.

La importancia de un antioxidante depende de su concentración, del medio donde actúa y de su habilidad para interactuar con sistemas regeneradores. (Martínez-Flórez et al. 2002b)

1.4.1.6 *Estructura Química de los flavonoides*

Los flavonoides químicamente se caracterizan por ser compuestos de bajo peso molecular, que tienen un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), con dos anillos fenilos A y B, unidos a través de un anillo C. Además, los flavonoides poseen un número variable de grupos hidroxilo lo cual les otorga propiedades de quelación del hierro; esto les confiere su capacidad antioxidante. Por otra parte, la biogénesis de los flavonoides es mixta ya que el anillo A proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y C de la ruta del ácido shikímico. (Martínez-Flórez et al. 2002c)

Existen diversos tipos de flavonoides en función de las cadenas de azúcares que se unen a ellos o si se encuentran libres únicamente como aglicona. Estas cadenas de azúcares que se unen a los flavonoides lo hacen generalmente en las posiciones C3 o C7 y los más frecuentes son la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa y el ácido D-glucurónico. Los flavonoides glicosídicos son más solubles en agua, pero menos reactivos frente a los radicales libres que su

aglicona. (Martínez-Flórez et al. 2002d)

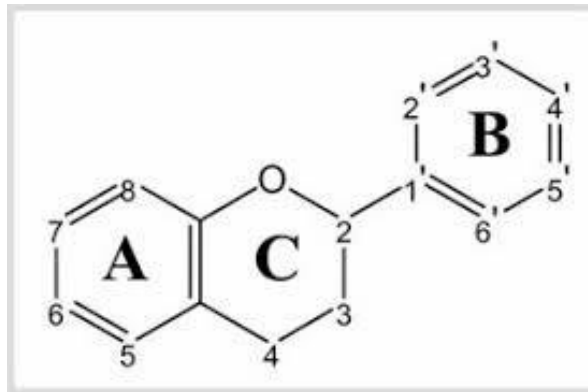


Figura 5-1. Estructura básica de un flavonoide

Fuente: (Martínez-Flórez et al. 2002)

1.4.1.7 Clasificación de los flavonoides

En función a su característica estructural se pueden clasificar en: flavonas como la catequina, flavonoles representados por la quercetina, flavonas como la diosmetina y las antocianidinas. Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. (Martínez-Flórez et al. 2002e)

- Con doble enlace entre las posiciones 2 y 3 a) flavonas con H en la posición 3 y b) flavonoles: con OH en la posición-3.
- Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3: a) flavononas: con H en la posición 3 y b) flavonololes: con OH en la posición 3.
- Chalconas: con el anillo C abierto.
- Isoflavonoides: con el anillo B en la posición 3 (3-fenil-gamma-'cromona).

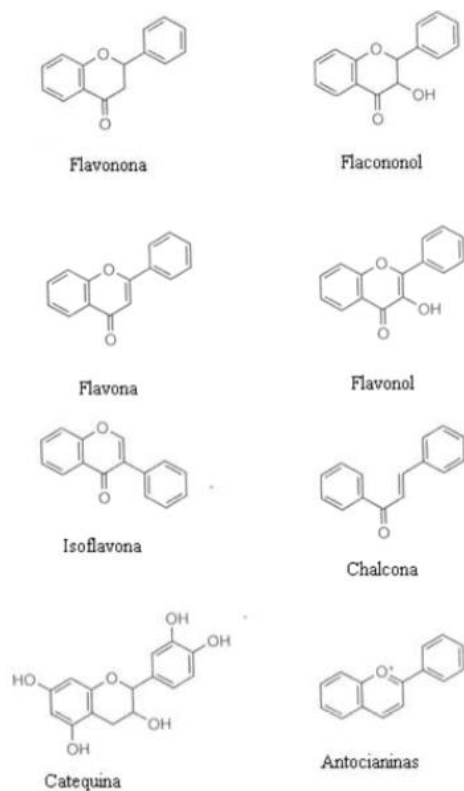


Figura 6-1. Tipos de flavonoides

Fuente: (Stalikas 2007)

1.4.2 Características físico químicas de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentan diferentes grados de solubilidad: agua, etanol, metanol (compuestos con grupo hidroxilo libres y glicósidos), acetato de etilo, cloroformo, éter etílico (agliconas esterificadas); se caracterizan por su carácter fenólico y debido a que contienen un sistema aromático conjugado muestran una intensa absorción de bandas en el espectro UV/VIS, lo cual nos permite realizar un estudio cualitativo y cuantitativo de estos compuestos. (Stalikas 2007b)

1.4.3 Acción antioxidante de los compuestos fenólicos

La capacidad de los polifenoles vegetales para actuar como antioxidantes en los sistemas biológicos fue ya reconocida en los años treinta; sin embargo, el mecanismo antioxidante fue ignorado en gran medida hasta hace poco tiempo. El creciente interés en los compuestos fenólicos se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, catalizar el transporte de electrones, y depurar radicales libres. (Paixão et al. 2007b)

Son efectivos en la captación de radicales libres de oxígeno y la peroxidación de lípidos, la cual está determinada por su capacidad de donadora de electrones o su reactividad con el hidrogeno; el comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su capacidad para quelar metales, ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos. También se ha informado que los polifenoles demuestran una acción antibacteriana, antimutagénica, antiinflamatoria y vasodilatadora. (Paixão et al. 2007c)

Los criterios químicos para establecer la capacidad antioxidante de los flavonoides, son:

- Presencia de estructura O-dihidroxi en el anillo B; que confiere una mayor estabilidad a la forma radical y participa en la deslocalización de los electrones.
- Doble ligadura, en conjunción con la función 4- oxo del anillo C41-42.
- Grupos 3- y 5-OH con función 4-oxo en los anillos A y C necesarios para ejercer el máximo potencial antioxidante.

Siguiendo estos criterios, el flavonoide quercetina es el que mejor reúne los requisitos para ejercer una efectiva función antioxidante. Su capacidad antioxidante medida como Trolox es de 4,7 mM, lo que resulta 5 veces mayor al demostrado por las vitaminas E y C y tiene una hidrosolubilidad similar a la de la vitamina E43. La función antioxidante de la quercetina muestra efectos sinérgicos con la vitamina C. El ácido ascórbico reduce la oxidación de la quercetina, de manera tal que combinado con ella permite al flavonoide mantener sus funciones antioxidantes durante más tiempo.

Por otra parte, la quercetina protege de la oxidación a la vitamina E, con lo cual también presenta efectos sinergizantes. Así, se ha demostrado que el flavonoide inhibe la fotooxidación de la vitamina E en la membrana celular de las células sanguíneas en presencia de hematoporfirina como fotosensibilizador. (Martínez-Flórez et al. 2002f)

Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. De esta manera bloquean la acción deletérea de dichas sustancias sobre las células. Sus efectos citoprotectores son, por ejemplo, bien patentes en fibroblastos de la piel humana, queratinocitos, células endoteliales y ganglios sensoriales cultivados en presencia de sulfoxina-butionina, un inhibidor irreversible de la glutatión sintetasa.

Diversos flavonoides han mostrado su eficiencia para eliminar los procesos de peroxidación lipídica del ácido linoleico o de los fosfolípidos de las membranas, la peroxidación de los glóbulos

rojos o la auto oxidación de los homogeneizados de cerebro. (Martínez-Flórez et al. 2002g)

Debido a que los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos, la preparación y obtención de productos con un alto contenido de estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, pudiendo incluso englobarlos dentro de los llamados alimentos nutraceuticos. Desde un punto de vista nutricional, esta actividad antioxidante se asocia con su papel protector en las enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Porras y López 2009)

CAPÍTULO II

2 MARCO METODOLÓGICO.

2.1 Lugar de la investigación.

Este trabajo de experimentación se lo realizó en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH)

2.2 Recolección del material vegetal.

Se recolecto muestras de la planta Ñachak (*Bidens andicola*), en la parroquia de San Andrés del cantón de Guano. La comprobación taxonómica de la planta se la realizó en el Herbario de la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo (ESPOCH).

2.3 Materiales, equipos y reactivos.

Para el trabajo de experimentación se utilizaron los siguientes materiales, equipos y reactivos; detallados a continuación:

2.3.1 *Material Vegetal.*

Se usó las partes aéreas de la planta Ñachak (*Bidens andicola*), es decir; las flores, hojas y tallos. La planta se secó a 50° C en una estufa marca Memmert SNB400 por 24 horas y posteriormente se trituró en un molino marca Arthur H. Thomas C.O hasta obtener partículas de 1 – 2 mm; con el objetivo de analizar los parámetros de calidad de la droga cruda, la obtención de extractos para los diferentes análisis y la concentración de fenoles/flavonoides de la planta para la fabricación los plásticos biodegradables

2.3.2 *Reactivo Químico.*

Para la fabricación de los plásticos biodegradables se adquirió quitosano con un grado de desacetilación ≥ 95 % de la empresa Xi' An Lukee Bio-Tech Co., Ltd. (China).

2.3.3 *Materiales de laboratorio utilizados.*

Tabla 1-2: Descripción de los materiales de laboratorio utilizados

CONTROL DE CALIDAD DE MATERIA PRIMA	
• Cápsulas de porcelana	
• Piseta	
• Reverbero	
• Crisoles de porcelana	
• Pinzas para cápsulas	
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	
• Frascos de color ámbar de 1000mL	
• Embudos simples	
• Trípodes	
• Vasos de precipitación de 250, 500 mL	
• Tubos de ensayo	
• Gradilla	
• Pipeta 10mL	
• Pipeta de 5mL	
• Pipeta de 1mL	
OBTENCIÓN DEL EXTRACTO	
• Tubos de ensayo tapa rosca	
• Frascos de color ámbar de 50, 1000 mL	
• Embudos	

• Trípode
• Papel filtro
• Probeta 100mL
• Pipeta 10 mL
• Pipeta 5mL
• Mangueras
PREPARACIÓN DE LAS PELÍCULAS ACTIVAS (FILMS)
• Cajas Petri
• Pipetas 10mL
• Vasos 50mL
• Probeta de 100mL
• Papel Aluminio
• Agitador de vidrio
• Espátula
ANÁLISIS INFRAROJO
• Cajas Petri
DENSIDAD, CONTENIDO DE HUMEDAD Y OPACIDAD
• Papel Aluminio
• Pinzas
• Probeta 100 mL
• Vasos 50 mL
• Pipetas 10 mL
• Tijeras
• Regla
SOLUBILIDAD EN AGUA
• Vasos 50 mL
• Probeta 100 mL
• Pipetas 10 mL
• Pinzas
PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA
• Vasos de Aluminio
• Ligas de caucho
• Cinta Scotch
• Papel Aluminio
• Pinzas para capsulas
CUANTIFICACIÓN FENOLES/FLAVONOIDES (ESPECTRO UV)
• Vasos de 50mL
• Balones aforados de 10mL

• Balones aforados de 25mL
• Probeta de 50mL
• Micropipeta automática de 1000uL
• Micropipeta automática de 100uL
• Tubos de vidrio de 10mL
• Puntas azules de 1000uL
• Puntas amarillas de 100uL
• Pipetas 10 mL
• Piseta
• Gradilla
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DPPH
• Micropipeta automática de 1000uL
• Micropipeta automática de 100uL
• Puntas azules de 1000uL
• Puntas amarillas de 100uL
• Vasos 50 mL
• Pipetas 10 mL
• Gradilla
• Probeta 50 mL
• Tubos de vidrio 25 mL
• Balón aforado 50 mL

Realizado por: Alex Hernández, 2018

2.3.4 Equipos.

Tabla 2-2: Equipos utilizados en la investigación

ANÁLISIS	EQUIPOS
Control de calidad materia prima y Tamizaje Fitoquímico	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Sonicador Marca Branson 2510
	Estufa Memmert SNB400
	Mufla IVYMEN N-8LITROS 1100°C
	Desecador
	Balanza analítica Radwag
Obtención del extracto	Vórtex mixer MRC S1 - 100
	Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath
	Congelador
Control de calidad del extracto	Refractómetro
	pH-metro Hanna Instrument
Preparación de películas activas (films)	Balanza analítica Radwag
	Agitador Magnético Thermo Scientific
	Estufa Memmert SNB400

	Termómetro infrarrojo
	Sonicador Marca Branson 2510
Infrarrojo (IR)	Espectrofotómetro infrarrojo Jasco 4100 FT/IR
Densidad, Contenido de Humedad y Opacidad	Micrómetro Mitutoyo Absolute
	Balanza analítica Radwag
	Estufa Memmert SNB400
	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
Solubilidad en Agua	Balanza analítica Radwag
	Agitador Magnético Thermo Scientific
	Estufa Memmert SNB400
Permeabilidad al vapor de agua	Desecador
	Balanza analítica Radwag
Cuantificación de fenoles y flavonoides totales y Ensayo de actividad antioxidante DPPH	Balanza analítica Radwag
	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
	Cronómetro

Realizado por: Alex Hernández, 2018

2.3.5 Reactivos.

Tabla 3-2: Descripción de los reactivos utilizados.

ANÁLISIS	REACTIVOS
Tamizaje fitoquímico	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Reactivo de Dragendorff ▪ Reactivo de Mayer ▪ Reactivo de Wagner ▪ Reactivo de Baljet ▪ Reactivo de Lieberman Buchard ▪ Reactivo para Catequinas ▪ Reactivo para resinas ▪ Reactivo de Fehling ▪ Reactivo de FeCl₃ ▪ Reactivo de Borntrager ▪ Reactivo de Shinoda ▪ Reactivo de Antocianidinas ▪ Cloruro férrico ▪ Magnesio metálico ▪ Cloruro de sodio (polvo)
Obtención del extracto	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Etanol 96% ▪ Agua destilada

<p>Preparación de películas activas (films)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Quitosano 95 % ▪ Ácido acético 2% ▪ Glicerol ▪ Nitrato de Sodio ▪ Cloruro de Calcio ▪ Agua destilada ▪ Extracto Hidroalcohólico <i>Bidens andicola</i> (BAHE)
<p>Permeabilidad al vapor de agua</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Cloruro de Aluminio ▪ Nitrato de Potasio
<p>Cuantificación de fenoles y flavonoides totales (espectro UV)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Soluciones de ácido gálico ▪ Metanol 98% ▪ Agua destilada ▪ Nitrito de Sodio 5% ▪ Tricloruro de aluminio 10% ▪ Hidróxido de sodio 1M ▪ Soluciones de quercetina ▪ Carbonato de sodio saturado ▪ Reactivo de Folin-Ciocalteu 20%
<p>Actividad de Captación de radicales libres DPPH</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Agua destilada ▪ Metanol 98% ▪ DPPH 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

Realizado por: Alex Hernández.

2.4 Técnicas y métodos.

2.4.1 Determinación de los parámetros de control de calidad de droga cruda.

Una vez recolectada la planta se procedió a realizar el control de calidad de la droga cruda para lo cual, se realizaron ensayos por triplicado, en base a métodos fisicoquímicos con el fin de garantizar la seguridad y eficacia de la droga que será analizada posteriormente. A continuación, se describen los parámetros analizados, cuyos procedimientos se encuentran establecidos en el folleto de Farmacognosia y Productos naturales (Miranda, 2006, pp. 38-64).

2.4.1.1 Determinación del contenido de humedad.

La determinación del contenido de humedad en la droga cruda es un ensayo necesario para determinar la calidad de la misma, ya que un elevado contenido de agua en las drogas vegetales aumenta el riesgo de contaminación microbiana y de hidrólisis de compuestos que posea la droga, provocando el deterioro de la misma.

Por esta razón es de gran importancia la determinación del contenido de humedad, como indicador de la estabilidad de los compuestos químicos presentes en las drogas vegetales, especialmente en aquellas que tienen un elevado contenido de humedad o que estén sujetas a absorber humedad con mayor facilidad.

El método gravimétrico es el más utilizado para esta determinación, debido a su sencillez; pero no es recomendable utilizarlo en drogas que contengan sustancias volátiles (Miranda, 2006a, pp. 38-64).

Procedimiento:

Se pesaron 2g de la droga cruda seca y molida con una desviación permisible de 0.5mg; siendo transferida a una cápsula de porcelana previamente tarada. La muestra dentro de la cápsula fue desecada a 105 °C durante 3 horas y seguidamente colocada en un desecador durante 15 minutos, donde se dejó enfriar a temperatura ambiente para ser pesada y nuevamente llevada a la estufa durante una hora más.

Posteriormente, la cápsula se colocó en el desecador para enfriarla hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante. (Miranda, 2006, pp. 38-64). Para realizar el cálculo y determinar el contenido de humedad de la droga cruda se aplicó la siguiente ecuación:

$$\%H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100$$

Donde:

H = pérdida en peso por desecación.

M₂ = masa de la cápsula con la muestra de ensayos (g)

M₁ = masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = masa de la cápsula vacía.

100 = factor matemático.

2.4.1.2 Determinación de cenizas totales.

El porcentaje de cenizas totales determina el contenido total de minerales de la muestra de estudio; es el residuo inorgánico que queda tras eliminar los compuestos orgánicos de la muestra seca, mediante la calcinación. El porcentaje de cenizas totales se determinó gravimétricamente (Miranda, 2006b, pp. 38-64).

Procedimiento:

Se pesaron 2g de droga cruda seca y molida con una desviación de 0.5mg; la muestra pesada se colocó en un crisol de porcelana previamente tarado. Se carbonizó la muestra en el crisol y una vez que se estuvo bien carbonizada la muestra fue colocada en una mufla a una temperatura de 700°C para su incineración, durante dos horas. Después de transcurrido ese tiempo, el crisol fue trasladado a una estufa a 105 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante; cabe recalcar que para alcanzar una masa constante los intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos. Para realizar el cálculo y poder determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación (Miranda, 2006c, pp. 38-64):

$$\%C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

C = porcentaje de cenizas totales.

M = masa del crisol vacío (g)

M₁ = masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂ = masa del crisol con la ceniza (g)

2.4.1.3 *Determinación de cenizas solubles en agua.*

El objetivo de este ensayo fue determinar la cantidad de material inorgánico que existe en las cenizas totales.

Procedimiento:

Se añadieron 15mL de agua al crisol con las cenizas totales obtenidas anteriormente; el crisol fue tapado con un vidrio reloj hervido durante 5 minutos. La solución obtenida fue filtrada a través de un papel filtro libre de cenizas. Este papel filtro fue colocado en el crisol utilizado inicialmente y calentado en el mismo hasta su carbonización; el crisol con la muestra fue colocado en una mufla a una temperatura de 700°C durante 2 horas; seguidamente, el crisol fue trasladado a una estufa a 105 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante; cabe recalcar que para alcanzar una masa constante los intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos (Miranda, 2006d, pp. 38-64). Para realizar el cálculo y poder determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación:

$$\%Ca = \frac{M_2 - M_a}{M_1 - M}$$

Donde:

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua.

M₂ = masa del crisol con las cenizas totales (g).

M_a = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M₁ = masa del crisol con la muestra de ensayo (g) M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.4.1.4 Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

El objetivo de este ensayo fue determinar el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico que contiene la droga vegetal. La materia arenosa presente en la droga vegetal es medida a través de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

Procedimiento:

Se añadieron 3 mL de ácido clorhídrico al 10% a las cenizas totales obtenidas anteriormente. Se calentó el crisol tapado con un vidrio reloj en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, se lavó el vidrio reloj con 5 mL de agua caliente uniéndolo al contenido del crisol. La solución obtenida fue filtrada a través de un papel filtro libre de cenizas, el residuo fue lavado con agua caliente repetidamente hasta que la solución filtrada acidulada con ácido nítrico (a la cual se añadió dos gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L), no indique la presencia de cloruros.

El filtrado conjuntamente con el residuo fue desecado en una estufa a 105°C y posteriormente transferido al crisol de porcelana utilizado inicialmente. Se colocó el crisol con la muestra en una mufla a 700°C durante 2 horas. Después de transcurrido ese tiempo, el crisol se trasladó a una estufa a 105 °C durante 15 minutos.

Posteriormente, el crisol se colocó en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente y se pesó hasta obtener masa constante; cabe recalcar que para alcanzar una masa constante los intervalos entre el calentamiento y el pesaje fueron de 30 minutos (Miranda, 2006e, pp. 38-64). Para realizar el cálculo y poder determinar el porcentaje de cenizas totales de la droga cruda se lo realiza con la siguiente ecuación:

$$\%B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde:

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

M₁= masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío (g)

M₂= masa del crisol con las cenizas ácido clorhídrico (g) 100= factor matemático.

2.4.2 Tamizaje fitoquímico.

Las pruebas de “screening” o tamizaje fitoquímico permiten identificar los metabolitos primarios y secundarios que posee la droga vegetal mediante reacciones de coloración o precipitación y que son de interés fitoquímico.

Las pruebas de tamizaje fitoquímico se caracterizan por ser sencillas, rápidas y muy selectivas para la determinación de clases o grupos de compuestos químicos que contiene la droga vegetal, utilizando un mínimo de recursos instrumentales de laboratorio. Después de haber determinado los parámetros de calidad de la droga cruda se procedió a realizar los extractos para realizar el tamizaje fitoquímico de la planta.

Procedimiento:

Las partes aéreas de la planta seca (tallos, hojas y flores), se sometieron a extracciones sucesivas con solventes de diferente polaridad como se muestra en el esquema a continuación basado en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006f, pp. 38-64).

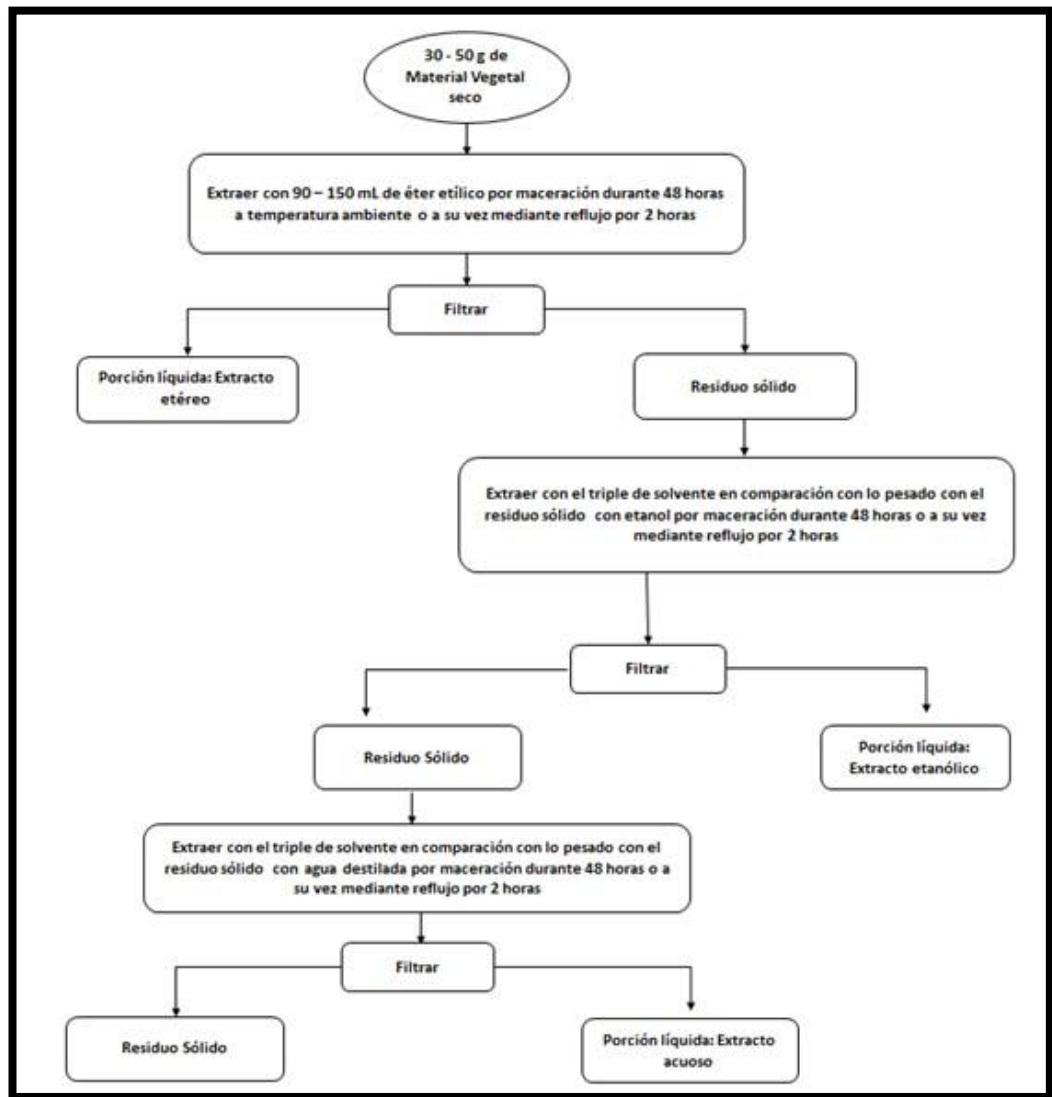


Figura 1-2. Protocolo para elaborar los extractos para el tamizaje fitoquímico.

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

Obtenidos cada uno de los extractos se procedió a realizar las diferentes reacciones de identificación de metabolitos secundarios siguiéndose los esquemas basados en Las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006g, pp. 38-64).

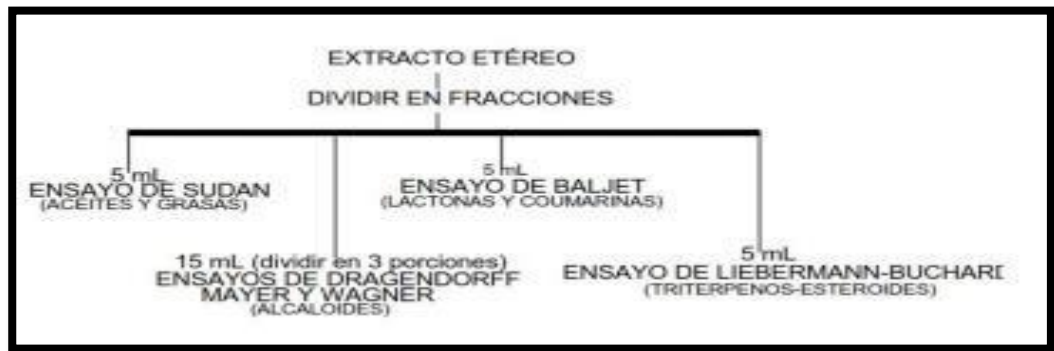


Figura 2-2. Protocolo para la realización del tamizaje fitoquímico de extracto etéreo.

Fuente: (Miranda, 2006, p. 40)



Figura 3-2. Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006, p. 40)



Figura 4-2. Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico de extracto acuoso.

Fuente: (Miranda, 2006, p. 41)

La metodología de los ensayos descritos anteriormente para la realización del tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos se detallan a continuación y se basan en las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda, 2006h, pp. 40-45).

2.4.2.1 *Ensayo de Sudán.*

Este ensayo detecta la existencia de compuestos grasos, para su efecto se tomaron 5 mL del extracto y se le añadió 1 mL de colorante de Sudán III o Sudán IV. Se calentó en un baño de agua hasta volatilizar el solvente. El ensayo se considera positivo si aparecen gotas o una laminilla coloreada de color rojo en el líquido o en las paredes del tubo de ensayo (Miranda, 2006i, pp. 40-45)

2.4.2.2 *Ensayo de Dragendorff.*

Este ensayo detecta la presencia de alcaloides, para lo cual se tomó una alícuota del extracto, se evaporizó el solvente y el residuo se disolvió en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. En el caso del extracto acuoso, se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado. A la solución acuosa ácida se adicionó 3 gotas del reactivo de Dragendorff. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda, 2006j, pp. 40-45).

2.4.2.3 *Ensayo de Mayer.*

Este ensayo al igual que el descrito anteriormente detecta la presencia de alcaloides, para lo cual se procedió de la misma forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Posteriormente, se añadió una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agitó y se filtró; finalmente, se agregaron 3 gotas del reactivo de Mayer. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda, 2006k, pp. 40-45).

2.4.2.4 *Ensayo de Wagner.*

Este ensayo también detecta la presencia de alcaloides, para la realización de este ensayo se procedió de la misma forma que los ensayos descritos anteriormente hasta obtener la solución ácida; posteriormente, se añadió 3 gotas del reactivo. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda, 2006l, pp. 40-45).

2.4.2.5 *Ensayo de Baljet.*

Este ensayo detecta la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, especialmente coumarinas. Para la realización de este ensayo se tomó una alícuota del extracto, se evaporó el solvente en un baño de agua caliente y se re disolvió el residuo en 1 mL de alcohol etílico; posteriormente, se añadió 1 mL de reactivo. Se considera este ensayo positivo cuando aparece una coloración rojiza (++) o un precipitado rojo (+++) (Miranda, 2006m, pp. 40-45)

2.4.2.6 *Ensayo de Liebermann-Burchard.*

Este ensayo detecta la presencia de compuestos triterpenos y/o esteroides, ya que ambos poseen un núcleo de androstano, insaturado en el anillo B en la posición 5 y 6. Para la realización de este ensayo se tomó una alícuota del extracto, se evaporó el solvente en un baño de agua caliente y el residuo se redisolvió en 1 mL de cloroformo; posteriormente, se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló; finalmente, por las paredes del tubo se dejaron resbalar 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

Se considera este ensayo positivo cuando existe un cambio rápido de coloración como se detalla a continuación:

- Rosado - Azul (muy rápido).
- Verde intenso - visible (aunque rápido).
- Verde oscuro – negro - final de la reacción (Miranda, 2006n, pp. 40-45)

2.4.2.7 *Ensayo de resinas.*

Para este ensayo se tomó a una alícuota del extracto etanólico y se adicionaron 10 mL de agua destilada. El ensayo se considera positivo cuando se observa la aparición de precipitado (Miranda, 2006ñ, pp. 40-45).

2.4.2.8 *Ensayo de la espuma.*

Este ensayo detecta la existencia de saponinas tanto esteroidales como triterpénicas. Para realizar este ensayo se tomaron 2 mL del extracto etanólico y se diluyó con 5 veces su volumen en agua, se mezcló y se agitó durante 10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persiste por un tiempo mínimo de 2 minutos (Miranda, 2006o, pp. 40-45).

2.4.2.9 *Ensayo de cloruro férrico.*

Este ensayo permite reconocer la existencia de compuestos fenólicos y taninos específicamente en el extracto alcohólico y principalmente taninos en el extracto acuoso. Para la realización de este ensayo se tomó una alícuota del extracto y se adicionó acetato de sodio para neutralizarlo y posteriormente se añadió 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. Se considera este ensayo positivo cuando existe un cambio de coloración como se detalla a continuación:

- Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.

- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos (Miranda, 2006p, pp. 40- 45).

2.4.2.10 *Ensayo de Shinoda.*

Este ensayo permite detectar la existencia de flavonoides en el extracto. Para realizar este ensayo se diluyó una alícuota del extracto alcohólico o acuoso en 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico.

Se esperó 5 minutos a que finalice la reacción y finalmente se adicionó alcohol amílico, se mezcló y se dejó reposar hasta que las fases se separen. El ensayo es positivo cuando el alcohol amílico se colorea amarillo, naranja, carmelita o rojo (Miranda, 2006q, pp. 40-45).

2.4.2.11 *Ensayo de Catequinas.*

Para realizar este ensayo se tomó una gota del extracto alcohólico con un capilar y se aplicó sobre papel filtro; seguidamente, se adicionó una gota de solución de carbonato de sodio sobre la mancha del extracto en el papel filtro. El ensayo se considera positivo cuando al observarse el papel filtro en una cámara UV parece una mancha verde carmelita. (Miranda, 2006r, pp. 40-45).

2.4.2.12 *Ensayo de Borntrager.*

Este ensayo detecta la presencia de quinonas en los extractos vegetales. Para realizar este ensayo se tomó una alícuota del extracto y se evaporó hasta sequedad en un baño de agua, el residuo se redisolvió con 1 mL de cloroformo. Se adicionó 1 mL de hidróxido de sodio al 5% en agua. Se mezcló y se agitó, se dejó en reposo hasta la separación de las fases. El ensayo se considera positivo cuando la fase superior, es decir; la fase acuosa alcalina toma una coloración rosada (++) o roja (+++) (Miranda, 2006s, pp. 40-45).

2.4.2.13 *Ensayo de Fehling.*

Este ensayo permite reconocer la existencia de azúcares reductores en el extracto. Para realizar este ensayo se evaporó el solvente, en caso de que este no se encuentra en agua, y se redisolvió el residuo en 2 mL de agua; posteriormente, se adicionó 2 mL de reactivo y se calentó en un baño de agua durante 10 minutos la mezcla. El ensayo es considerado positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo (Miranda, 2006t, pp. 40-45).

2.4.3 Preparación del extracto hidroalcohólico de *Bidens andicola*.

Después de haber realizado el tamizaje fitoquímico se procedió a obtener el extracto etanólico al 70% (hidroalcohólico), de *Bidens andicola*, para la realización del control de calidad y su posterior concentración para usarlo en la preparación de los films. El extracto fue elaborado siguiendo el procedimiento citado a continuación y basado en el trabajo de (Andersen y Markham 2006) con ligeras modificaciones.

Procedimiento:

Se pesó 100 g de material seco de la partes áreas de la planta de *Bidens andicola* y se realizó una maceración con etanol al 70 % añadiendo 500 mL de este, se procedió a sonicar el extracto por 30 minutos para eliminar el exceso de aire y finalmente se dejó reposar por 72 h agitándolo ocasionalmente. Este procedimiento se lo realizo por duplicado obteniendo dos extractos hidroalcohólico de *Bidens andicola* con 100 g cada uno.

Transcurridas las 72 h se procedió a la concentración del extracto en un Rotavapor BUCHI R110 & B-465 Water Bath a 50°C, -0.5 bar hasta eliminar completamente el solvente en ambos macerados y obtener un extracto hidroalcohólico concentrado de los compuestos de *Bidens andicola*.

Obtenido el extracto concentrado de *Bidens andicola* se procedió a filtrar para eliminar cualquier tipo de impurezas y se congelo el extracto por 12 h en un congelador a una temperatura de -4°C.

Pasadas las 12 h se descongelo el extracto y se filtró nuevamente para poder utilizarlo en la fabricación de los films de quitosano con un extracto hidroalcohólico concentrado de *Bidens andicola* (BAHE). (Andersen y Markham 2006)

2.4.4 Control de calidad del extracto hidroalcohólico de *Bidens andicola*.

2.4.4.1 Requisitos organolépticos

- Determinación de olor: Se tomó una tira de papel de 10 cm de largo y se introdujo el extremo en la muestra de ensayo, se olió y se determinó la correspondencia con la característica del extracto. (Miranda, 2006u, pp. 56-60).

- Determinación del color: Se tomó un tubo de ensayo limpio y seco y se llenó las tres cuartas partes con la muestra de ensayo, se observó el color, la transparencia y la existencia o no de partículas. (Miranda, 2006v, pp. 56-60).

2.4.4.2 *Determinación de sólidos totales.*

Es la determinación de la variación de la masa debido a la pérdida de sustancias volátiles mediante un proceso de evaporación de la porción de ensayo y secado del residuo en una estufa.

Procedimiento:

Para el ensayo se tomaron 5 mL del extracto y se llevó a una cápsula previamente tarada, se evaporó hasta sequedad en un baño de agua caliente. La cápsula se trasladó hacia una estufa a 105°C durante aproximadamente 3 horas, después se colocó la cápsula en una desecadora para que se enfríe y alcance temperatura ambiente hasta masa constante, para lo cual se mantuvo un tiempo desecado de 1 hora. Este ensayo se realizó por triplicado (Miranda, 2006z, pp. 56-60).

La cantidad de sólidos totales (ST), se calculó en porcentaje utilizando la siguiente formula:

$$ST = \frac{P_r - P}{V} \times 100$$

Donde:

P_r= masa de la cápsula más el residuo (g)

P= masa de la cápsula vacía (g)

V= volumen de la porción de ensayo.

100=factor matemático para el cálculo

2.4.4.3 *Índice de refracción.*

El índice de refracción constituye la relación entre el seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Procedimiento:

Para realizar este ensayo se colocó en el prisma del refractómetro una gota de agua destilada, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparece en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del

retículo sobre la línea límite de los campos claro y oscuro.

Posteriormente se colocó una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, el termoprisma fue cerrado y se enfocó la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición. Este ensayo se realizó por triplicado (Miranda, 2006x, pp. 56-60).

2.4.4.4 Medición del pH.

El pH es un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función de los iones hidrógeno.

Procedimiento:

La medición del pH se realizó mediante un instrumento medidor de pH digital, para lo cual se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH, posteriormente se determinó el valor de pH de la muestra. Este ensayo se realizó por triplicado (Miranda, 2006y, pp. 56-60)

2.4.5 Preparación del film

La preparación de los films fue realizada siguiendo la metodología usada por (Wang et al. 2013d), una solución de quitosano a concentración al 4 wt% fue preparada disolviendo el quitosano en 2% v/v de una solución de ácido acético a 60°C con agitación constante a 800 rpm. Glicerol (Plastificante) fue añadido a la solución de quitosano en una concentración de 30% de peso usado de quitosano. Las soluciones de BAHE a diferentes concentraciones fueron preparadas mezclando BAHE con agua destilada a 50°C con una agitación constante a 200 rpm por 10 min.

Las soluciones de films fueron preparadas mezclando la solución de quitosano y la solución de BAHE en una relación 1:1 según su peso, obteniendo así films de quitosano/BAHE a concentraciones (% peso) de 10%, 20%, 30% y 40% del quitosano.

Después de una agitación constante a 800 rpm por 60 min a 60°C y desgasificación, la cantidad deseada de solución de film fue distribuida en cajas Petri de plástico para su posterior secado a una temperatura de 50°C y 30% de humedad relativa por 24 h.

Los bioplásticos obtenidos fueron mantenidos en una cámara a temperatura ambiente y 75% de humedad relativa por 48 h antes de su uso experimental.

2.4.6 *Análisis Infrarrojo (Caracterización de los films)*

El espectro ATR-FTIR obtenido de los films de quitosano/BAHE fueron medidos usando un Espectrofotómetro Jasco FT/IR-4100 con un prisma ATR de diamante monolítico para investigar las interacciones del quitosano con los fenoles y flavonoides de *B. andicola* en los films. La medición se la hizo directamente tocando la superficie de los films. Una resolución de 4 cm⁻¹ fue empleada y 64 escaneos se realizaron para cada espectro en un rango de 4000 a 1000 cm⁻¹

2.4.7 *Densidad, contenido de humedad y opacidad.*

La densidad del film fue determinada usando datos de peso y volumen de los films. El volumen fue calculado usando el área y espesor de los films. El espesor fue medido usando un micrómetro de mano digital (Mitutoyo Absolute, Tester Sangyo Co. Ltd., Tokyo, Japan) con una precisión de 0.001 mm en cinco diferentes posiciones de cada film (desde el centro hasta los extremos del film) y los valores promedios fueron tomados.

El contenido de humedad de los films fue determinado midiendo la pérdida de peso de los films sometidos a secado en una estufa Memmert SNB400 a 105 ±0.5 °C por 24 h. Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y los valores promedios fueron tomados. El contenido de humedad fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de Humedad (\%)} = \frac{M_w - M_d}{M_w} \times 100\%$$

Donde M_w es el peso de los films acondicionados a una humedad relativa de 75% y M_d es el peso seco de los films.

La opacidad fue determinada siguiendo el método de (Park, Je y Kim 2004) midiendo la absorbancia de los films a una longitud de onda de 600 nm usando un espectrofotómetro UV (Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA).

Los films fueron cortados en una pieza rectangular y fueron colocados directamente en la celda de prueba del espectrofotómetro. Una celda vacía fue usada como referencia. La opacidad de los films fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$O = \frac{Abs_{600}}{d}$$

Donde O es la opacidad, Abs_{600} es el valor de la absorbancia a 600 nm y d es el espesor del film (mm).

2.4.8 Solubilidad en Agua.

La solubilidad en agua de los films fue definida como el porcentaje de film disuelto después de 24 h de inmersión en agua destilada y fue calculado siguiendo el método usado por (Khoshgozaran-Abras et al. 2012a).

Los films de quitosano/BAHE previamente equilibrados a una humedad relativa al 75% fueron cortados en tiras de 1cm X 4 cm y sumergidos en 50 mL de agua destilada a una agitación constante de 100 rpm. Después de 24 h las tiras fueron retiradas del agua y se sometieron a secado a una temperatura de 105 ± 0.5 °C por 24 h y el peso final de films secos (W_f) fue medido.

El peso inicial de los films secos (W_i) fue determinado mediante el secado de las tiras en una estufa a 105 °C hasta peso constante (Wang et al. 2013e). Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y los valores promedios fueron tomados. La solubilidad en agua de los films fue calculada usando la siguiente ecuación:

$$\text{Solubilidad en agua (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100\%$$

2.4.9 Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua fue determinada gravimétricamente usando un método estandarizado GB1037-88 (similar al método ASTM) (Wang et al. 2013f). Una copa especial de aluminio con 2.4 cm de diámetro interno, 5 cm de diámetro externo (área expuesta: 19.62 cm²), y 6.3 cm de profundidad fue usada.

La copa fue llenada con 2 g de CaCl₂ anhidro completamente seco para generar una humedad relativa de 0% y fue sellada con el film, después se colocó la copa en un desecador a temperatura ambiente con una solución saturada de KNO₃ para generar una humedad relativa del 95%. La copa fue pesada periódicamente (cada 2 h por 18h) usando una balanza analítica con una precisión de 0.1 mg (Radwag - Balances & Scales, Poland).

La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) de las películas se determinó a partir de

la gráfica del peso ganado frente al tiempo. La pendiente de la porción lineal de esta gráfica representa la cantidad en estado estable de vapor de agua que se difunde a través de la película por unidad de tiempo. La permeabilidad de vapor de agua fue expresada en gramos por metro cuadrado por cada día. Tres muestras por cada film fueron analizadas.

La permeabilidad de vapor de agua fue calculada multiplicando el valor de WVTR por el espesor del film y dividiendo por la diferencia de vapor de agua en el ambiente del film. El WVTR y la permeabilidad de vapor de agua fue calculando usando las siguientes ecuaciones (Garcia et al. 2009) (Srinivasa, Ramesh y Tharanathan 2007).

$$WVTR = \frac{\text{pendiente}}{A}$$
$$\text{Permeabilidad al vapor de agua} = \frac{WVTR \times d}{p \times (R_1 - R_2)}$$

La permeabilidad de vapor de agua fue expresada en ($\text{g mm m}^{-2} \text{ day}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$), A es el área expuesta, d es el espesor del film, p es la saturación de presión de vapor de agua a la temperatura de análisis (25°C), R_1 es la humedad relativa en el desecador, R_2 es la humedad relativa dentro de la copa de aluminio.

2.4.10 Cuantificación de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu.

El contenido total de fenoles tanto del extracto hidroalcohólico como de los films de quitosano/BAHE (*Bidens andicola*) fueron determinados usando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (F-C) (Singleton y Rossi 1965) con ligeras modificaciones (Wang et al. 2013g).

Se realizó una curva de calibración con un estándar de ácido gálico con concentraciones en un rango de 0 a 15 ppm para cuantificar los fenoles en el extracto y los films.

La solución de los films con extracto fue preparada remojando 125 mg de muestra de film en 15 mL de agua destilada por 24h.

Se mezcló 0.1 mL de solución de film en 6 mL de agua destilada con 0.5 mL del reactivo de F-C; después de 8 minutos se añadió a la mezcla 1.5 mL de carbonato de sodio al 10% y se llevó a un volumen total de 10 mL aforando con agua destilada y esta mezcla se dejó incubar en una habitación oscura a temperatura ambiente por 2 horas.

Pasada las 2 horas se procedió a la lectura en el espectrofotómetro UV (Cole-Parmer Instrument

Company, Illinois, USA) a una longitud de onda de 765 nm y el resultado final fue expresado en mg equivalentes de ácido gálico (GAE)/g de peso seco. Todos los análisis fueron realizados por triplicado para cada una de las muestras y el valor promedio fue tomado como final.

2.4.11 Cuantificación de flavonoides totales mediante un método colorimétrico.

El contenido total de flavonoides tanto del extracto hidroalcohólico como de los films de quitosano/BAHE (*Bidens andicola*) fueron determinados usando el método colorimétrico utilizando cloruro de aluminio. (Boukhris et al. 2013)

Se preparó una curva de calibración con una solución estándar de quercetina en un rango de 0 a 50 ppm. Se mezcló 1 mL de solución de film con 4 mL de agua destilada y 300 uL de NaNO₂ al 5% agitando en el vortex por 1 minuto y dejando reposar por 5 minutos.

Después se añadió 300 uL de AlCl₃ al 10% y se agito en el vortex por 1 minuto. Pasados seis minutos se adicionaron 2mL de NaOH 1M y se dejó reposar 15 minutos en un cuarto oscuro a temperatura ambiente.

Finalmente se leyó en un espectrofotómetro UV (Cole-Parmer Instrument Company, Illinois, USA) a una longitud de onda de 510 nm. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina/mL. Cada una de las muestras fue analizada por triplicado y los valores promedios fueron tomados como finales.

2.4.12 Actividad de captación del radical libre de DPPH[·]

La actividad antioxidante de los films de quitosano/BAHE (*Bidens andicola*) fue evaluada mediante el ensayo de captación de radicales libres de DPPH[·] siguiendo el método de (Blois 1958) y (Siripatrawan y Harte 2010) con ligeras modificaciones (Wang et al. 2013h).

La solución de ensayo de DPPH[·] fue preparada mezclando 9 mL de la solución del extracto de film con 3 mL de una solución de DPPH[·] en metanol (10⁻³ mol L⁻¹). Después la mezcla fue agitada en un vortex VM-300 (Gemmy Industrial Corporation, Taipei, Taiwan) por 1 min, la mezcla finalmente fue incubada por 30 min en una habitación oscura a temperatura ambiente.

La muestra final fue leída a una longitud de onda de 517 nm y el poder antioxidante de cada muestra fue calculado mediante la siguiente formula:

$$\text{Actividad Captadora de radicales libres (\%)} = \frac{ADPPH - AS}{ADPPH} \times 100$$

Donde ADPPH es el valor de la absorbancia medida a 517 nm de la solución de DPPH en metanol y AS es el valor de la absorbancia medida a 517 nm de la solución de ensayo de DPPH. Cada una de las muestras fue analizada por triplicado y los valores promedios fueron tomados como finales.

2.4.13 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con la ayuda del programa SPSS versión 22 donde la diferencia entre factores y niveles se evaluó mediante un análisis de varianza (ANOVA). Las pruebas de rango múltiple de Duncan se utilizaron para identificar qué grupos eran significativamente diferentes de otros grupos, en base a estos parámetros se planteó la siguiente hipótesis estadística:

Ho: No existen diferencias significativas entre la variable respuesta y el factor aplicado si $p \geq 0,05$.

Hi: Existen diferencias significativas entre la variable respuesta y el factor aplicado si $p < 0,05$.

Se aceptó la hipótesis o la hipótesis nula según el nivel de significancia de cada parámetro.

CAPÍTULO III

3 MARCO DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

3.1 Parámetros de control de calidad de la droga cruda

Después de haber realizado los diferentes ensayos al material vegetal se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 1-3: Resultados obtenidos del control de calidad de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Parámetro	Partes aéreas de <i>Bidens andicola</i> (%)	Referencia USP # 28
Contenido de humedad	8,58±0,02	7-14%
Cenizas totales	5,34±0,05	Hasta 12%
Cenizas solubles en agua	3,24±0,44	Hasta 7%
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0,21±0,04	Hasta 5%

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

Se determinó el control de calidad para las partes aéreas de *Bidens andicola* que se pueden observar en la tabla 1-3 donde se obtuvo que el contenido de humedad de las partes aéreas de *Bidens andicola* fue de 8,58±0,02 lo que nos indica que la planta fue recolectada, secada y almacenada de manera correcta; el contenido de humedad es determinante para mantener a los compuestos en la planta con una buena estabilidad ya que una alta humedad puede dar problemas de hidrólisis en los compuestos o crecimiento de hongos, bacterias u otros microorganismos en la planta resultado perjudicial y podría alterar su composición. (World Health Organization. Pharmaceuticals Unit 1998a)

La cantidad de cenizas indica el contenido de sales inorgánicas y minerales de la muestra que pueden ser: Carbonatos, fosfatos, sulfatos, nitritos, calcio, potasio entre los más frecuentes. Además se pueden encontrar otros ácidos orgánicos como oxálico, málico, acético.

La cantidad de cenizas solubles en agua se relaciona con el contenido de sales solubles que se encuentran en la muestra, mientras que las cenizas solubles en ácido nos indican los oxalatos o carbonatos que se pueden encontrar en el material vegetal. (World Health Organization. Pharmaceuticals Unit 1998b)

Todos los resultados obtenidos en el control de calidad de las partes aéreas de *Bidens andicola* se encontraron dentro del límite de referencia establecido por la USP #28 donde se obtuvo el porcentaje de cenizas totales ($5,34 \pm 0,05$), cenizas solubles en agua ($3,24 \pm 0,44$), cenizas insolubles en ácido clorhídrico ($0,21 \pm 0,04$); indicando la ausencia de contaminación por arena, tierra o sílices del material vegetal. Además estos resultados fueron muy similares a los reportados en investigaciones anteriores. (Vinueza et al. 2017b).

3.2 Tamizaje fitoquímico.

Para la realización del tamizaje fitoquímico del extracto de las partes aéreas de *Bidens andicola* se siguió las Normas Ramales de drogas crudas, extractos y tinturas (Miranda 2006) donde se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 2-3: Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Ensayo	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Sudan	+	NA	NA
Dragendorff	-	-	-
Mayer	-	-	-
Wagner	-	-	-
Baljet	-	+	NA
Liebermann-Burchard	-	-	NA
Resinas	NA	-	NA
Espuma	NA	+	+
Cloruro férrico	NA	+++	+++
Shinoda	NA	+++	+++
Catequinas	NA	+	NA
Borotrager	NA	-	NA
Fehling	NA	++	++

+ (Escaso), ++ (Moderado), +++ (Abundante); NA (No aplica)

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

Como se puede observar en la tabla 2-3 del tamizaje fitoquímico de *Bidens andicola*, en el extracto etéreo hubo poca cantidad de compuestos grasos ya que dio un ligero resultado positivo al ensayo de Sudán.

En caso del extracto alcohólico presento escaso contenido de cumarinas, catequinas y saponinas verificados por los ensayos de baljet, catequinas y de espuma; aunque se pudo determinar un abundante contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y un moderado contenido de azúcares ya que los ensayos de cloruro férrico, shinoda y fehling dieron un resultado positivo.

Igualmente en el extracto acuoso se evidencio compuestos fenólicos, flavonoides y moderada presencia de azúcares, además de una leve presencia de saponinas. En todos los extractos resultonegativo las pruebas para identificar la presencia de alcaloides por lo que podemos concluir que la planta no presenta ningún tipo de alcaloide.

Podemos corroborar los resultados obtenidos ya que en el estudio realizado por (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998e) se caracterizaron metabolitos secundarios de la planta *Bidens andicola* donde obtuvieron compuestos de tipo flavónico, principalmente flavonoles 7- O-glicosidos teniendo como agliconas quercetina o quercetina 3 – metil éter y cadenas de azúcares que incluyen β -D-glucopiranososa, α -L-ramnopiranososa y β -D-xilopiranososa; además de chalconas ester glicosido; además en el estudio sobre el efecto antiinflamatorio de *Bidens andicola* realizado por (Vinueza et al. 2017c) muestran resultados muy similares en el tamizaje fitoquímico.

Debido a la abundante cantidad de compuestos fenólicos de la planta *Bidens andicola* existe una gran ventaja de añadir compuestos fenólicos en el quitosano ya que puede aportar propiedades deseadas como antioxidantes, antimicrobianas, antidiabéticas o propiedades antitumorales (Curcio et al. 2009b), para fabricar agentes encapsulantes y también para elaborar materiales para el empaque de comida con una gran cantidad de aplicaciones en el área de alimentos, farmacia e industrias ambientales. (Wang et al. 2013i)

3.3 Control de calidad del extracto hidroalcohólico de *B. andicola*.

Una vez terminado el tamizaje fitoquímico se procedió a realizar el control de calidad del extracto hidroalcohólico al 70% concentrado de las partes aéreas de *Bidens andicola* donde se obtuvo los siguientes resultados que se pueden observar en la tabla 3-3.

Tabla 3-3: Determinación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Parámetro	Extracto Etanólico 70% de las partes aéreas de <i>Bidens andicola</i>
Características Organolépticas	
• Olor	Dulce - Característico
• Color	Amarillo-Verdoso
• Aspecto	Líquido-Pastoso
Características Físico - Químicas	
• pH	6,225 ± 0,040
• Índice de refracción	1,367 ± 0,000
• Sólidos Totales	22,50 ± 0,080

Realizado por: Alex Hernández, 2018

El extracto etanólico de las partes aéreas de *Bidens andicola* presentó un olor dulce, característico de la planta debido posiblemente a los flavonoides glicosídicos que posee (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998f); de igual manera los flavonoides favorecen el color amarillento del extracto.

Se obtuvo un pH ligeramente ácido ($6,225 \pm 0,040$); indica que posee una abundante cantidad de compuestos fenólicos. (Stalikas 2007c)

En el caso de los parámetros de índice de refracción el valor fue de ($1,367 \pm 0,000$), sólidos totales ($22,50 \pm 0,080$), el índice de refracción indica una buena solubilidad de metabolitos en el solvente de extracción, mientras que la cantidad de sólidos totales es alta debido a que se concentró gran cantidad de extracto hasta eliminar todo el solvente y tener gran cantidad de compuestos de la planta.

3.4 Análisis Infrarrojo (Caracterización de los films)

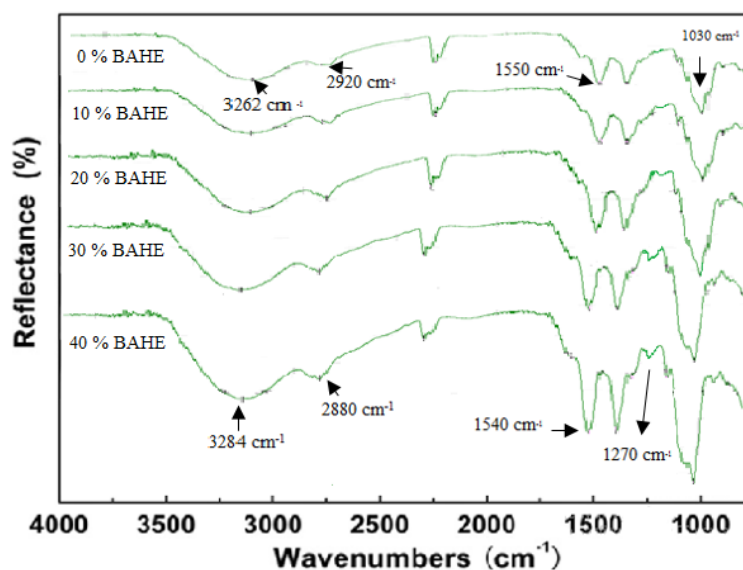


Gráfico 1-3. ATR-FTIR espectro de los films de quitosano/BAHE

Realizado por: Alex Hernández, 2018

La espectroscopia FT-IR fue usada para observar las interacciones entre el quitosano y BAHE. Cuando dos componentes se mezclan, las mezclas físicas frente a las interacciones químicas se reflejan en cambios en los picos de espectros característicos (Xu et al. 2005a). Los espectro ATR-FTIR de películas de quitosano / BAHE se muestran en el Gráfico 1-3. Se puede ver que el pico de N-H del quitosano ubicado en 1550 cm⁻¹ se dobla cambiando a 1540 cm⁻¹ con el aumento de la concentración de BAHE (Wang et al. 2013j).

La banda ancha a 3262 cm⁻¹ fue el estiramiento OH doblándose a 3284 cm⁻¹ con la adición de BAHE, además se encuentra con el estiramiento NH en la misma región. Un pequeño pico cerca de 1655 cm⁻¹ se debió al estiramiento C = O. En el rango 1600-1422 cm⁻¹ (estiramiento en C=C del anillo aromático) (Xu et al. 2005b) En el rango 2880 cm⁻¹ (estiramiento C-H) se puede ver como se dobla a 2920 cm⁻¹ con la adición de BAHE.

Otro cambio fue el pico que surgió a 1270 cm⁻¹ atribuible al grupo C-O de los compuestos fenólicos de BAHE (Shurvell 2006a). Como los grupos de C-O-C se encuentran en los picos en el estiramiento simétrico del rango entre 1020-1075 cm⁻¹ (Shurvell 2006b), las observaciones en el gráfico nos indican que hubo cambios en la estructura química del quitosano después de agregar los compuestos de BAHE.

Los resultados del análisis infrarrojo FT-IR sugieren que la incorporación de BAHE al quitosano ocasionó interacciones entre ambas estructuras.

3.5 Densidad, contenido de humedad y opacidad

Tabla 4-3. Densidad, contenido de humedad y opacidad de los films de quitosano/BAHE con diferentes concentraciones de BAHE.

Films	Densidad (g cm ⁻³)	Contenido de Humedad (%)	Opacidad (A mm ⁻¹)
0 % BAHE	1,072 ± 0,019 ^a	44.43 ± 0,153 ^c	0.730 ± 0,042 ^a
10 % BAHE	1,152 ± 0,049 ^b	35.67 ± 1,531 ^b	2.244 ± 0,096 ^b
20 % BAHE	1,154 ± 0,085 ^b	35.40 ± 0,887 ^b	2.463 ± 0,055 ^c
30 % BAHE	1,188 ± 0,053 ^c	34.06 ± 0,686 ^b	3.067 ± 0,126 ^d
40 % BAHE	1,224 ± 0,107 ^d	32.10 ± 1,291 ^a	3.648 ± 0,176 ^e

Realizado por: Alex Hernández, 2018

Los valores ± están dados por la desviación estándar. Diferentes letras en la misma columna indican que son significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Anexo 1Q; 2Q; 3Q) al analizarlos por el análisis de rangos múltiples de Duncan.

Se puede observar en la Tabla 4-3 los efectos de BAHE a diferentes concentraciones en la densidad, contenido de humedad y opacidad de los films de quitosano/BAHE. La incorporación de BAHE afectó significativamente a la densidad ($p < 0.05$) (Anexo P) de los films, aunque este aumento a mayor concentración de BAHE y no hubo una diferencia significativa entre el contenido de humedad a diferentes concentraciones de BAHE. (Anexo 2Q)

El contenido de humedad y la opacidad de los films se vieron afectadas significativamente ($p < 0.05$) (Anexo P) a mayores concentraciones de BAHE, debido a que las interacciones entre el quitosano y BAHE son responsables del menor contenido de humedad en los films quitosano/BAHE esto porque las interacciones podrían disminuir la disponibilidad de grupos hidroxilo y amino, lo que, a su vez, limitaría las interacciones de entre el quitosano y el agua a través de enlaces de hidrógeno.

Los valores altos de Opacidad indican una menor transparencia y un mayor grado de opacidad. El film de control de quitosano (sin BAHE) fue más transparente que los que contienen BAHE, y el valor de opacidad de los films de quitosano/BAHE aumentó a una mayor concentración de BAHE, esto se esperaba ya que el cambio en la opacidad es atribuido al contenido de BAHE. Comparado con los films de quitosano incorporado con polifenoles del té (TP) (Wang et al. 2013k) los films de quitosano/BAHE fueron más opacos mientras que en films de quitosano incorporados con un extracto de té verde (GTE) (Siripatrawan y Harte 2010), los films de quitosano/BAHE resultaron más transparentes cuando las concentraciones de BAHE y GTE fueron similares.

3.6 Solubilidad en Agua

Tabla 5-3. Solubilidad de agua (%) de los films de quitosano/BAHE

BLANCO	10% BAHE	20% BAHE	30% BAHE	40% BAHE
19,82±0,48	13,27± 0,15	12,75±1,36	15,45±2,07	16,38±1,07

Realizado por: Alex Hernández, 2018

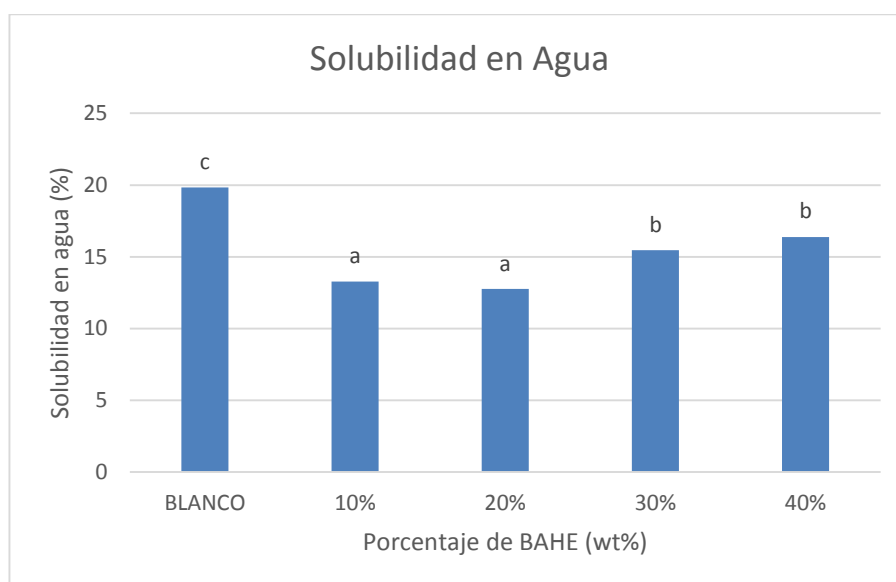


Gráfico 2-3. Solubilidad de agua de los films de quitosano/BAHE

Realizado por: Alex Hernández, 2018

Los resultados presentados tanto en la tabla 5-3 como en el Gráfico 2-3 mostraron que la película de quitosano sin BAHE tenía una solubilidad de 19.82 ± 0.48 % que estaba cercano al valor (23.52 ± 1.26 %) reportado por (Wang et al. 2013). Sin embargo, cuando se agregó BAHE, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) (Anexo P) de la solubilidad en agua debido a las interacciones entre el quitosano y los compuestos fenólicos de BAHE donde estos limitarían las interacciones entre el quitosano y el agua a través de enlaces de hidrógeno.

Comparado con los films de quitosano incorporado con polifenoles del té (TP) (Wang et al. 2013m) los films de quitosano/BAHE presentaron valores menores de solubilidad en agua resultando beneficioso ya que la solubilidad en agua es una propiedad importante de los films para aplicaciones en la protección de alimentos.

3.7 Permeabilidad de Vapor de Agua

Tabla 6-3. Permeabilidad al vapor del agua de los films de quitosano/BAHE. Los resultados fueron expresados en ($\text{g mm m}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$)

BLANCO	10 % BAHE	20% BAHE	30% BAHE	40% BAHE
7,15	3,41	3,23	3,03	2,49

Realizado por: Alex Hernández, 2018

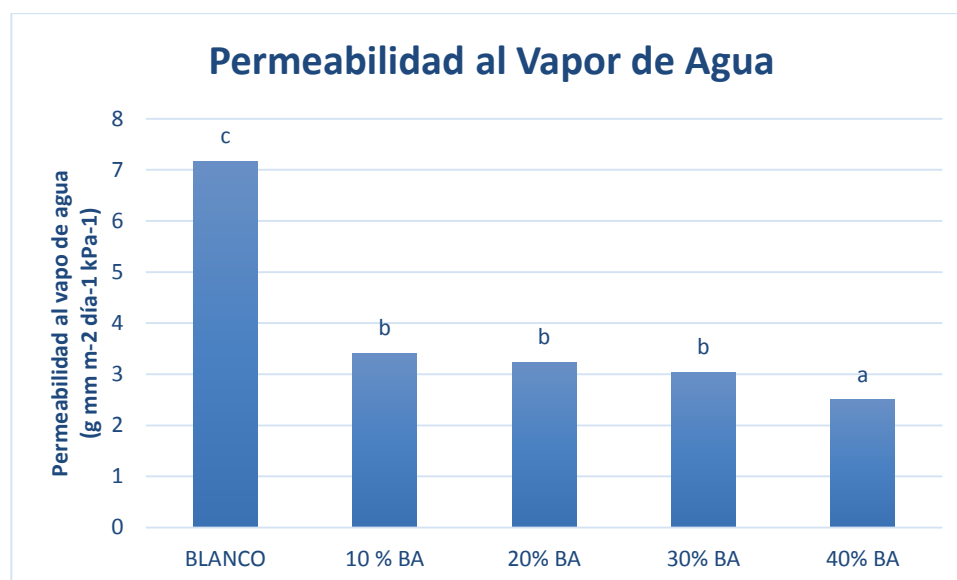


Gráfico 3-3. Permeabilidad al vapor del agua de los films de quitosano/BAHE.

Realizado por: Alex Hernández, 2018

Una función principal de una película que recubre los alimentos es a menudo impedir la transferencia de humedad entre la comida y la atmósfera circundante, entonces la permeabilidad al vapor de agua de la película debe ser lo más bajo posible (Bourtoom y Chinnan 2008). Como se puede observar en la tabla 6-3 y el gráfico 3-3 se muestra la permeabilidad al vapor al agua de los films de quitosano/BAHE donde se muestra que la permeabilidad al vapor de agua de los films de quitosano /BAHE disminuyó significativamente ($p < 0.05$) (Anexo P), la permeabilidad al vapor de agua del film de quitosano que contiene 40% de BAHE alcanzó los $2,49 \text{ g mm m}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$.

En general, la transmisión de vapor de agua depende tanto de la difusividad como de la solubilidad de las moléculas de agua en la matriz de la película. Una posible razón de la disminución en WVP de las películas de quitosano / TP podría ser las interacciones entre quitosano y TP indicado por los espectros ATR-FTIR, que probablemente reduciría la disponibilidad de los grupos hidrofílicos en quitosano y disminuye sus interacciones con el agua. (Wang et al. 2013n)

Como se presenta en la Tabla 4-3, la densidad de las películas de quitosano/BAHE se elevó con

el aumento de la concentración de BAHE. Una densidad más alta de las películas sugirió que las cadenas de quitosano se acumularon de forma compacta en los films, esto podría reducir el espacio intersticial en la matriz de quitosano y así permitir una disminución de la velocidad de difusión de las moléculas de agua a través de las películas. (Wang et al. 2013o)

Comparando con los valores obtenidos de films de quitosano/polifenoles del té (TP) reportados por (Wang et al. 2013p); films de quitosano/almidón (Bourtoom y Chinnan 2008) y films de quitosano/aloevera (Khoshgozaran-Abras et al. 2012b) se obtuvo mejores resultados mejorando la permeabilidad al vapor de agua de los films, donde el estudio de films de quitosano/TP a una concentración de 40% de TP alcanzó los $5,77 \text{ g mm m}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ mientras que los films de quitosano/BAHE obtuvo al 40% de concentración un valor de $2,49 \text{ g mm m}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$, esto puede ser debido a la mayor cantidad de compuestos fenólicos en los films de quitosano/BAHE.

Para la película de quitosano sin BAHE en este estudio, la permeabilidad al vapor de agua medido fue de $7,15 \text{ g mm m}^{-2} \text{ día}^{-1} \text{ kPa}^{-1}$ similar a los valores informados por (Bourtoom y Chinnan 2008).

3.8 Contenido de fenoles totales

El contenido de fenoles totales del extracto etanólico al 70% de las partes aéreas de *Bidens andicola* se cuantificaron mediante el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi 1965) para lo cual se elaboró una curva de calibración de ácido gálico como estándar, la cual presentó una ecuación de la recta de $y = 0,0026x + 0,0286$; $R^2 = 0,9991$ (Grafico 1I)

Tabla 7-3: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico concentrado de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Extracto	Fenoles totales expresados como mg de Ácido gálico/mL de extracto	Porcentaje
Etanólico 70%	743,85 mgEQ/mL	74,38 %

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de fenoles totales del extracto hidroalcohólico concentrado se muestran en la tabla 7-3 donde se observa una elevada cantidad de compuestos fenólicos. Según literatura las partes aéreas de la planta *Bidens andicola* presenta un contenido de fenoles totales de $54.4 \pm 0.08 \text{ mg}$ de ácido gálico por g de planta (Borneo et al. 2009); al igual que el estudio realizado por (Vinueza et al. 2017d) mostró alto contenido de compuestos fenólicos de la planta *Bidens andicola*.

En el análisis de fenoles totales de los films de quitosano/BAHE se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 8-3. Contenido de fenoles totales de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo. Los resultados fueron expresados como (mg ácido gálico/g peso seco)

DIA	BLANCO	10% BAHE	20% BAHE	30% BAHE	40% BAHE
0	1,37	143,669	182,203	220,248	228,241
6	1,24	124,788	154,029	215,689	214,833
12	1,24	74,588	90,937	100,964	101,852
18	1,1	28,803	48,243	55,440	52,502
24	1,08	32,992	42,676	44,614	46,378

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

El contenido total de fenoles de los films de quitosano/BAHE (*Bidens andicola*) fueron determinados usando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (F-C) (Singleton y Rossi 1965) con ligeras modificaciones (Wang et al. 2013q), para lo cual se elaboró una curva de calibración de ácido gálico como estándar, la cual presento una ecuación de la recta de $y = 0,0026x + 0,0286$; $R^2 = 0,9991$ (Grafico 1I)

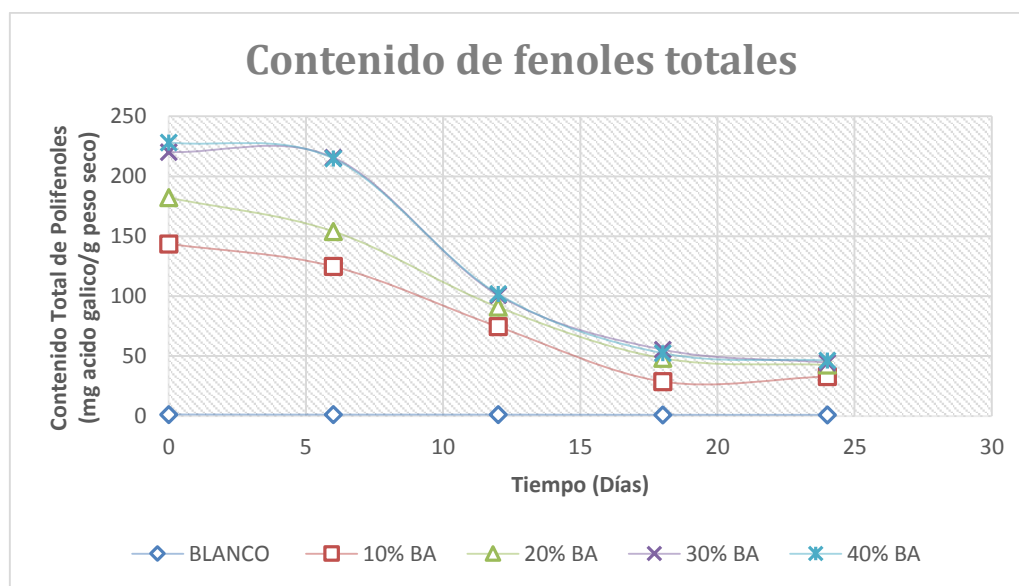


Gráfico 4-3. Contenido de fenoles totales de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo.

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

El potencial antioxidante de los films de quitosano/BAHE se determinó mediante el análisis de fenoles totales donde se utilizó el método colorimétrico de F-C para obtener una estimación cruda de los compuestos fenólicos en los films. Este método se basa en la reducción de un complejo de fosfowolframato-fosfomolibdato por los compuestos fenólicos a un producto de reacción azul. (Paixão et al. 2007).

Como se puede ver en la tabla 8-3 y el Gráfico 4-3 se muestra el contenido fenólico de los films de quitosano/BAHE y su cambio a lo largo de los días. Se observa que después de incorporar BAHE el contenido de fenoles totales de los films de quitosano/BAHE aumenta significativamente su contenido con respecto al blanco ($p < 0.05$) (Anexo P; Anexo 6Q) y con el incremento de concentración de BAHE.

El valor más alto de contenido de fenoles fue 228,241 mgEQ de ácido gálico/g en el film que contenía 40% de BAHE, mientras que el film de control (blanco) tuvo apenas 1,37 mgEQ de ácido gálico/g. Comparándolo con el estudio de quitosano con polifenoles del té el contenido de fenoles totales de los films al 20% de TP y 40% de TP obtuvieron 110,10 mgEQ de ácido gálico/g y 170,10 mgEQ de ácido gálico/g respectivamente (Wang et al. 2013r); mientras que el contenido de los films de quitosano/BAHE a una concentración similar fue de 228,241 mgEQ de ácido gálico/g al 40% de BAHE y 182,203 mgEQ de ácido gálico/g al 20 % de BAHE lo que muestra una cantidad mayor. Esto debe ser probable al gran contenido de fenoles totales que presentó el extracto concentrado de *Bidens andicola*, sin embargo se notó un decremento significativo del contenido de fenoles totales a lo largo de los días. Esto debido a la oxidación que sufren los compuestos fenólicos con el aire.

3.9 Contenido de flavonoides totales

Para calcular los flavonoides totales del extracto etanólico concentrado de *Bidens andicola* se utilizó un método colorimétrico con tricloruro de aluminio (Boukhris et al. 2013) donde se realizó una curva de calibración usando como estándar quercetina para interpolar la absorbancia obtenida y obtener la cantidad de flavonoides totales en el extracto, la ecuación de la recta del estándar de quercetina fue $y = 0,0012x + 0,0256$ y con un $R^2 = 0,999$ (Gráfico 2I).

Tabla 9-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides totales del extracto hidroalcohólico concentrado de las partes aéreas de *Bidens andicola*.

Extracto	Flavonoides totales expresados como mg de Quercetina/mL de extracto	Porcentaje
Etanólico 70%	426,86 mgEQ/mL	42,68 %

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

En la tabla 9-3 se observan los resultados obtenidos de la cuantificación de flavonoides totales del extracto concentrado de *Bidens andicola*, donde se ve un alto contenido de flavonoides. El resultado total de flavonoides fue menor al obtenido de fenoles totales; este resultado fue esperado ya que hay que tomar en cuenta que los flavonoides son un subgrupo de los compuestos fenólicos

por lo que los flavonoides se deberán encontrar en menor cantidad que el total de compuestos fenólicos. (Gracia Nava 2006)

Comparando con el estudio sobre las propiedades antiinflamatorias de *Bidens andicola* reportado por (Vinueza et al. 2017) mostró igualmente un alto contenido de flavonoides como el de este estudio. El abundante contenido de flavonoides le brinda a la planta de *Bidens andicola* varias propiedades medicinales debido a su poder antioxidante como protector en enfermedades cardiovasculares y cánceres; además de poseer propiedades antiinflamatorias, antivirales y antialérgicas (Martínez-Flórez et al. 2002), esto es algo deseable en este estudio ya que se quiere dar una funcionalidad antioxidante a los films de quitosano donde aprovecharía estas características.

En el caso del contenido de flavonoides totales en los films de quitosano/BAHE se obtuvo los siguientes resultados:

Tabla 10-3. Contenido de flavonoides totales de los films de quitosano/BAHE. Los resultados fueron expresado como (mg quercetina/g peso seco)

DIA	BLANCO	10% BAHE	20% BAHE	30% BAHE	40% BAHE
0	0,78	82,43	104,54	126,37	130,96
6	0,71	71,60	88,38	123,76	123,27
12	0,71	42,79	52,17	57,93	58,44
18	0,63	16,52	27,68	31,81	30,12
24	0,61	18,93	24,48	25,60	26,61

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

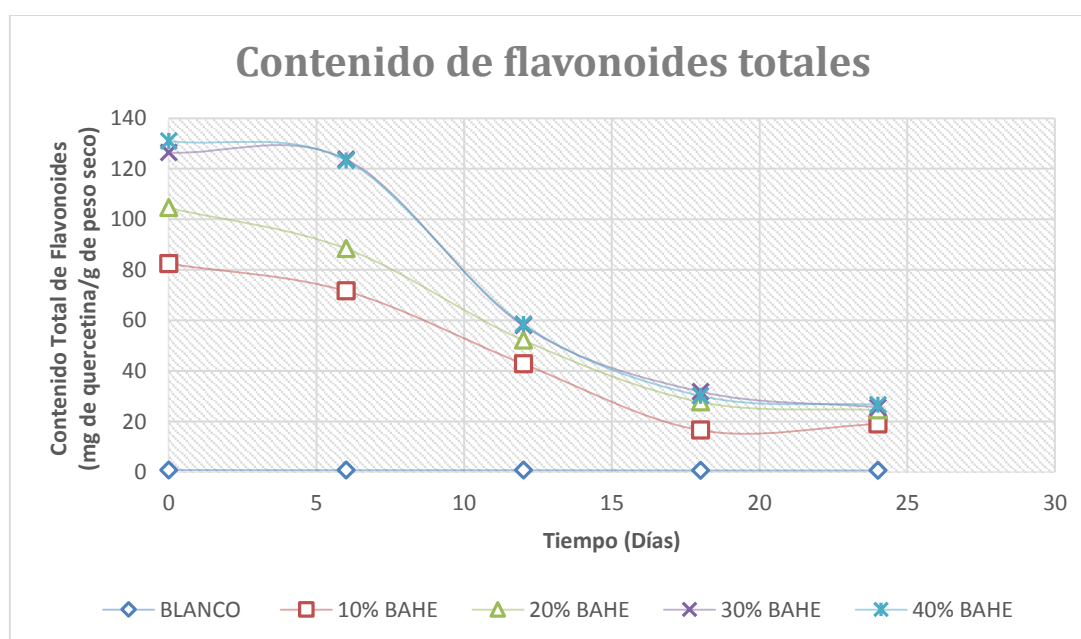


Gráfico 5-3. Contenido de flavonoides totales de los films de quitosano/BAHE.

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

Los compuestos fenólicos son efectivos en la captación de radicales libres de oxígeno y la peroxidación de lípidos, la cual está determinada por su capacidad donadora de electrones o su reactividad con el hidrógeno; el comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos parece estar relacionado con su efecto de quelar metales, ya sea manteniendo o incrementando su actividad catalítica o reduciéndolos. También se ha informado que los polifenoles poseen acción antibacteriana, antimutagénica, antiinflamatoria y vasodilatadora. (Paixão et al. 2007d)

Como se puede ver en la tabla 10-3 y en el gráfico 5-3 se muestra el contenido de flavonoides totales de los films de quitosano/BAHE y su cambio a lo largo de los días. Se observa que después de incorporar BAHE el contenido de flavonoides totales de los films de quitosano/BAHE aumenta significativamente su contenido con respecto al blanco ($p < 0.05$) (Anexo P; Anexo 7Q) y con el incremento de concentración de BAHE.

El valor más alto de contenido de flavonoides fue 130,96 mgEQ de quercetina/g en el film que contenía 40% de BAHE, mientras que el film de control (blanco) tuvo apenas 0,78 mgEQ de quercetina/g. Teniendo en cuenta el estudio realizado por (Vinueza et al. 2017e) se reportó que la planta *Bidens andicola* presenta un elevado contenido de flavonoides igual que en este estudio y además los films de quitosano/BAHE a una concentración de 40 % de BAHE presentaron un total de 228,241 mgEQ de ácido gálico/g de compuestos fenólicos y mediante este análisis podemos observar que cantidad comprenden al subgrupo de flavonoides especialmente quercetina y quercetina-3-O-metil que son los que le darían mayor poder antioxidante a los films de quitosano/BAHE.

Sin embargo se notó un decremento significativo del contenido de flavonoides totales a lo largo de los días. Esto debido a la oxidación que sufren los compuestos fenólicos con el aire.

3.10 Actividad captadora del radical libre DPPH[·]

Para calcular la capacidad captadora de radicales libres de los films de quitosano/BAHE se usó el ensayo de captación de radicales libres de DPPH[·] siguiendo el método de (Blois 1958) y (Siripatrawan y Harte 2010) con ligeras modificaciones (Wang et al. 2013s) donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 11-3. DPPH Actividad captadora de radicales libres (%) de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo.

DIA	BLANCO	10% BAHE	20% BAHE	30% BAHE	40% BAHE
0	3,58	55,30	60,97	81,61	82,17
6	3	51,95	56,01	68,87	68,76
12	2,8	48,90	52,38	62,10	59,91
18	2	37,59	46,65	52,02	52,33
24	1,5	32,84	35,18	49,45	50,13

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

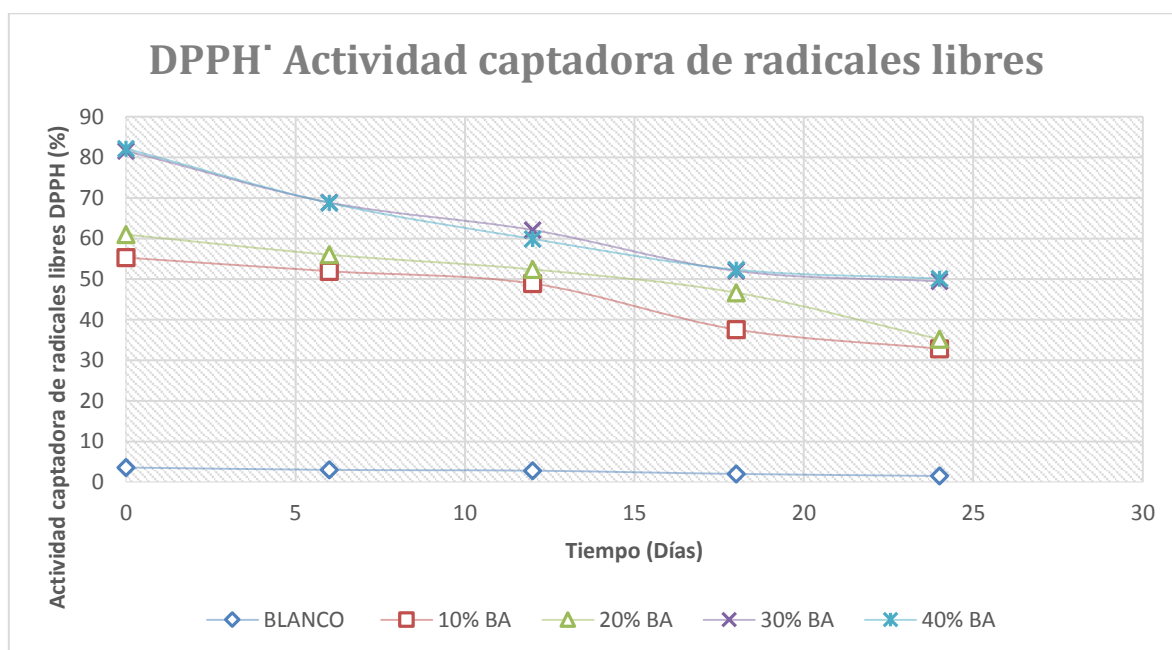


Gráfico 6-3. DPPH Actividad captadora de radicales libres de los films de quitosano/BAHE a lo largo del tiempo.

Realizado por: Alex Hernández, 2018.

La capacidad antioxidante, especialmente la captación de radicales libres, es muy importante debido al deterioro que generan los radicales libres en la comida y los organismos vivos (Paixão et al. 2007e). El radical de DPPH[·] ha sido ampliamente usado para medir la habilidad de los compuestos como captadores de radicales libres y así poder evaluar su poder antioxidante (Kanatt, Chander y Sharma 2008).

El DPPH[·] es un radical libre estable que se disuelve en metanol y su color púrpura muestra una absorción característica a una longitud de onda de 517 nm. Las moléculas antioxidantes capturan al radical libre mediante una donación de hidrógeno y el color de la solución de ensayo de DPPH[·] se vuelve amarillo claro resultando en un decremento en su absorbancia. La captación de radicales libres es uno de los mecanismos conocidos de como los antioxidantes inhiben la oxidación lipídica (Moreira et al. 2008).

Como se puede observar en la tabla 11-3 y en el grafico 6-3 se muestra la actividad de captación del radical libre DPPH[·] de los films de quitosano/BAHE y su cambio a lo largo de los días. El film de quitosano sin BAHE mostró una pequeña actividad de captación del radical libre que fue similar a la reportada por (Wang et al. 2013t). Sin embargo, la incorporación de los compuestos fenólicos de BAHE incrementó significativamente ($p < 0.05$) (Anexo P) la captación del radical libre DPPH[·] y a una mayor concentración de BAHE hubo una mayor actividad.

La más alta actividad de captación del radical libre vino de la concentración de BAHE al 40% siendo de 82,17 % de inhibición aunque no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) (Anexo 8Q) con la inhibición de la concentración de BAHE al 30 % que fue de 81,61 %, por lo que se deduce que a una mayor concentración de 30% de la formulación usada no existe más interacción entre los compuestos de *Bidens andicola* y el quitosano.

Comparando con otros estudios donde se usaron distintos compuesto antioxidantes para formar films de quitosano se identificó que la actividad de captación del radical libre DPPH medida en este estudio fue mayor que la reportada por (Wang et al. 2013) que formó films de quitosano con polifenoles de té (TP) y de igual manera comparando con el estudio realizado por (Beltran y Sandoval 2017) donde se realizó la incorporación de quercetina a los films de quitosano presentó una actividad similar a la de este estudio, esto fue esperado ya que los compuestos fenólicos de *Bidens andicola* contienen una gran cantidad de flavonoides como la quercetina y quercetina 3-O-metil (De Tommasi, Piacente y Pizza 1998g); finalmente en un estudio donde se incorporó ácido gálico al quitosano (Pasanphan y Chirachanchai 2008) resultó en una menor capacidad de inhibición, donde el ácido gálico generó una inhibición del 100%.

En el gráfico 6-3 se observa que la captación del radical libre de los films de quitosano/BAHE disminuyo a lo largo de los días, esto debido probablemente a la pérdida de compuestos fenólicos en los films por la oxidación al aire.

CONCLUSIONES.

- El material vegetal seco de *Bidens andicola* obtenido, cumplió con las especificaciones de la USP #28 por lo que es apta para su estudio. El tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos de las partes aéreas de *Bidens andicola* presento compuestos fenólicos y flavonoides; azúcares reductores y una escasa presencia de saponinas, catequinas, cumarinas y compuestos grasos.
- La incorporación del extracto hidroalcohólico concentrado de *Bidens andicola* (BAHE) en el quitosano influyó considerablemente en las propiedades fisicoquímicas de los films de quitosano/BAHE. La incorporación de BAHE causo interacciones entre el quitosano y los compuestos fenólicos de *Bidens andicola* y le dio una apariencia más oscura a los films, además disminuyó el contenido de humedad y solubilidad en agua de los films de quitosano/BAHE.
- La permeabilidad al vapor de agua fue reducida por la aplicación de BAHE a los films de quitosano y se aumentó considerablemente la capacidad antioxidante de los films, por lo que los films de quitosano/BAHE no solo tienen una mejor capacidad de impedir la transmisión de humedad sino que también poseen una resistencia a la oxidación, lo que hace a los films de quitosano/BAHE compuestos con gran potencial para ser usados como material de empaque activo en los alimentos.
- El extracto hidroalcohólico concentrado de *Bidens andicola* presentó una cantidad de fenoles totales de 743,85 mgEQ de ácido gálico/mL y una cantidad de flavonoides de 426,86 mgEQ de quercetina/mL, mientras que los films de quitosano/BAHE presentaron una cantidad de fenoles totales de 226,24; 220,24; 182,20 y 142,66 mgEQ de ácido gálico/g a las concentraciones de 40 %, 30,%, 20% y 10% de BAHE, respectivamente, mientras que el contenido de flavonoides en los films fue de 130,96; 126,37; 104,54 y 82,43 mgEQ de quercetina/g a las concentraciones de 40%, 30%, 20% y 10% de BAHE, respectivamente, aunque el valor de estos fue disminuyendo con el tiempo debido a la oxidación de los compuestos con el aire.
- El poder antioxidante de los films de quitosano/BAHE fue determinado por el contenido de compuestos fenólicos totales y por la capacidad de captación del radical libre DPPH donde se obtuvo una inhibición del 82,17 %; 81,61 %; 60,57% y 55,30 % a las concentraciones de 40%, 30%, 20% y 10% de BAHE, respectivamente, mostrando la mayor capacidad a las concentraciones de 30 % y 40% aunque según el análisis estadístico no hubo una diferencia significativa entre las dos concentraciones.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda para futuros trabajos realizar estudios del análisis de la microestructura e inhibición a los microorganismos de los films de quitosano/BAHE.
- Realizar un estudio similar donde se fabriquen films de quitosano incorporando compuestos aislados de la planta *Bidens andicola*.
- Realizar estudios donde los films de quitosano/BAHE se apliquen como material de empaque activo para alimentos o incluso en uso agrícola como aditivos para la protección de la cosecha o generar vendajes como dispositivos médicos.

BIBLIOGRAFÍA.

- AIDER, M.** Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 43, no. 6, pp. 837–842. 2010.
- ANDERSEN, Ø.M. y MARKHAM, K.R.** *Flavonoids. Chemistry, Biochemistry and Applications*. 2006.
- BARNES, D.K.A., et.al.** Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. , pp. 1985–1998. 2009.
- BELTRAN, H.I. y SANDOVAL, G.** Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films Enzymatic Modification of Chitosan with Quercetin and Its Application As Antioxidant Edible Films 1. , no. February. 2017.
- BLOIS, M.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, vol. 181, pp. 1199–1200. 1958.
- BORNEO, R., et.al.** Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their in vitro testing in a model food system. *Food Chemistry*, vol. 112, no. 3, pp. 664–670. 2009.
- BOUKHRIS, M., et.al.** Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, pelargonium graveolens. *Phytotherapy Research*, vol. 27, no. 8, pp. 1206–1213. 2013.
- BOURTOOM, T. y CHINNAN, M.S.** Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT - Food Science and Technology*, vol. 41, no. 9, pp. 1633–1641. 2008.
- BRESLIN, V.T.** Degradation of Starch-Plastic Composites in a Municipal Solid Waste Landfill. , vol. 1, no. 2, pp. 127–128. 1993.
- COMA, V.** Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, vol. 78, no. 1–2, pp. 90–103. 2008.

- CURCIO, M., et.al.** Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 57, no. 13, pp. 5933–5938. 2009.
- D. HOORNWEG, P. BHADA-TATA, C.K.** Environment: Waste production must peak this century. *Nature*, vol. 502, pp. 615–617. 2013.
- DARMADJI, P. y IZUMIMOTO, M.** Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, vol. 38, no. 2, pp. 243–254. 1994.
- DE-LA-CRUZ, H., VILCAPOMA, G. y ZEVALLOS, P.A.** Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 111, no. 2, pp. 284–294. 2007.
- DE TOMMASI, N., PIACENTE, S. y PIZZA, C.** Flavonol and chalcone ester glycosides from *Bidens andicola*. *Journal of Natural Products*, vol. 61, no. 8, pp. 973–977. 1998.
- ELIZABETH, M., ESCOBEDO, R., et.al.** Synthesis and biological activity of chalcones. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, pp. 7–14. 2012.
- GARCÍA, E., FERNÁNDEZ, I. y FUENTES, A.** Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu. *Universitat politècnica de Valencia*, vol. 1, pp. 2–8. 2015.
- GARCIA, N.L., et.al.** Physico-Mechanical properties of biodegradable starch nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 294, no. 3, pp. 169–177. 2009.
- GEYER, R., JAMBECK, J.R. y LAW, K.L.** Production , use , and fate of all plastics ever made. , no. July, pp. 25–29. 2017.
- GÓMEZ-RÍOS, D., BARRERA-ZAPATA, R. y RÍOS-ESTEPA, R.** Comparison of process technologies for chitosan production from shrimp shell waste: A techno-economic approach using Aspen Plus®. *Food and Bioproducts Processing*, vol. 103, pp. 49–57. 2017.
- GRACIA NAVA, M.A.** Cuantificación de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos Naturales. *Universidad Autonoma de Querétaro*, pp. 1–4. ISSN 03788741. 2006.
- GUANCHA C, M.A., et.al.** Propiedades de conservación: recubrimiento a base de quitosano y

Aloe vera aplicado en papa criolla (*Solanum phureja*). *Informador Técnico (Colombia)*, vol. 80, no. 1, pp. 6–16. 2016.

HARBONE, J.B. Plant phenolics. *Encyclopedia of plant physiology, secondary plant products*. Vol. 8. New York: Springer-Verlag. 1980.

HILGERT, N.I. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 76, no. 1, pp. 11–34. 2001.

HIRANO, S. Chitin Biotechnology Applications. *Biotechnology Annual Review*, vol. 2, no. C, pp. 237–258. 1996.

Instituto Nacional de Estadística y Censos: Modulo Ambiental de Hogares. [en línea]. Disponible en: http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Hogares_2014/Documento_tecnico_Modulo_Ambiental_Hogares_2014.pdf. 2014.

JAMBECK, J.R., et.al. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, vol. 347, no. September 2014, pp. 768–771. 2015.

JO, C., LEE, J.W., LEE, K.H. y BYUN, M.W. Quality properties of pork sausage prepared with water-soluble chitosan oligomer. *Meat Science*, vol. 59, no. 4, pp. 369–375. 2001.

KANATT, S.R., CHANDER, R. y SHARMA, A. Chitosan glucose complex - A novel food preservative. *Food Chemistry*, vol. 106, no. 2, pp. 521–528. 2008.

KHOSHGOZARAN-ABRAS, S., et.al. Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. *Carbohydrate Polymers*, vol. 87, no. 3, pp. 2058–2062. 2012.

LEE, B., POMETTO, A.L., FRATZKE, A. y BAILEY, T.B. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 3, pp. 678–685. 1991.

LI, J., et.al. Quercetin-3-methyl ether suppresses proliferation of mouse epidermal JB6 p+ cells by targeting ERKs. *Carcinogenesis*, vol. 33, no. 2, pp. 459–465. 2012.

- LIU, J., et.al.** Protocatechuic acid grafted onto chitosan: Characterization and antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 89, pp. 518–526. 2016.
- MAJID, I., et.al.** Novel food packaging technologies: Innovations and future prospective. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 2016.
- MARIN, C; & PARRA, S.** *Bidens andicola*. , pp. 170. 2015.
- MARÍN, C. y PARRA, S.** *Bitácora de flora: Guía visual de plantas de páramos en Colombia*. Bogota: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. 2015.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S., et.al.** Los flavonoides: Propiedades y acciones antioxidantes. *Nutricion Hospitalaria*, vol. 17, no. 6, pp. 271–278. 2002.
- MIRANDA, M.** Farmacognosia y productos naturales. En: F. VARELA (ed.), *Normas Ramales de drogas crudas y extractos y tinturas*. 6ª ed. La Habana - Cuba: s.n., pp. 32–62. 2006.
- MOREIRA, L., et.al.** Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 46, no. 11, pp. 3482–3485. 2008.
- NAM, Y.S., et.al.** Effect of the degree of deacetylation on the thermal decomposition of chitin and chitosan nanofibers. *Carbohydrate Polymers*, vol. 80, no. 1, pp. 291–295. 2010.
- NARAYAN, R.** Development of Standars for Degradable Plastics by ASTM Subcommittee D-20.96 on Environmentally Degradable Plastics. *Biodegradable Polymers and Plastics*., vol. ACS Sympos, no. No. 575, pp. 176–187. 1991.
- NIÑO, M.C.K.A.** *Elaboracion de Plasticos Biodegradables a partir de polisacaridos y su estudio de biodegradacion a nivel de laboratorio y campo*. S.l.: Univesidad Autonoma de Nuevo Leon. 1996.
- OTey, F.H. y WESTHOFT, R.P.** Starch-based semipermeable films. 1984.
- PAIXÃO, N., et.al.** Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, vol. 105, no. 1, pp. 204–214. 2007.

- PARK, P.J., JE, J.Y. y KIM, S.K.** Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydrate Polymers*, vol. 55, no. 1, pp. 17–22. 2004.
- PASANPHAN, W. y CHIRACHANCHAI, S.** Conjugation of gallic acid onto chitosan: An approach for green and water-based antioxidant. *Carbohydrate Polymers*, vol. 72, no. 1, pp. 169–177. 2008.
- PENICHE COVAS, C.A., ARGÜELLES-MONAL, W. y GOYCOOLEA, F.M.** Chitin and chitosan: Major sources, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, vol. 1, pp. 517–542. 2008.
- Plásticos biodegradables o bioplásticos. [en línea].** [Consulta: 24 diciembre 2017]. Disponible en:
<http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=48>.
2007
- PORRAS, A. y LÓPEZ, A.** *Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos*. 2009. S.l.: s.n. 2009.
- RAMÍREZ, M.Á., et.al.** Chitin is a biodegradable polymer widely spread in nature. *Biotechnología Aplicada*, vol. 27, pp. 270–276. 2010.
- REHECHO, S., et.al.** Ethnopharmacological survey of medicinal plants in Nor-Yauyos, a part of the Landscape Reserve Nor-Yauyos-Cochas, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 133, no. 1, pp. 75–85. 2011.
- RUTHERFROD, FRANK. DUNSON, W.** *The permeability of chitin film to water and solutes*. 1984.
- SHAHIDI, F. y NACZK, M.** *Phenolics in food and nutraceuticals*. 2006.
- SHUKLA, S.K., et.al.** Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 59, pp. 46–58. 2013.
- SHURVELL, H.F.** Spectra- Structure Correlations in the Mid- and Far-Infrared. *Handbook of Vibrational Spectroscopy*, vol. 3, pp. 1783–1816. 2006.

- SINGLETON, V.L. y ROSSI, J.A.** Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158. 1965.
- SIRIPATRAWAN, U. y HARTE, B.R.** Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocolloids*, vol. 24, no. 8, pp. 770–775. 2010.
- SOLIS, A., CUTIPA, L. y DELLE MONACHE, F.** Contribución al Estudio Fitoquímico de *Bidens andicola*. *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, no. 9, pp. 122–123. 1991.
- SRINIVASA, P.C., RAMESH, M.N. y THARANATHAN, R.N.** Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, vol. 21, no. 7, pp. 1113–1122. 2007.
- STALIKAS, C.D.** Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, vol. 30, no. 18, pp. 3268–3295. 2007.
- STRUSZCZYK, M.H.** Global Requirements for Medical Applications of Chitin and its Derivatives. *Polish Chitin Society*, vol. 9, pp. 95–102. 2006.
- TOFFEY, A. y GLASSER, W.G.** Chitin derivatives III Formation of amidized homologs of chitosan. *Cellulose*, vol. 8, no. 1, pp. 35–47. 2001.
- TOMMASI, N. De y PIZZA, C.** Flavonol and Chalcone Ester Glycosides from *Bidens leucantha*. *Journal of Natural Products*, vol. 3864, no. 96, pp. 270–273. 1997.
- TSENG, H.L., et.al.** Quercetin 3-O-methyl ether protects FL83B cells from copper induced oxidative stress through the PI3K/Akt and MAPK/Erk pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, vol. 264, no. 1, pp. 104–113. 2012.
- VINUEZA, D.R., et.al.** Assessment of anti-inflammatory activity and cytotoxicity of freeze dried hydroalcoholic extract of *Bidens andicola* on isolated neutrophils. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, vol. 10, no. 6, pp. 160–163. 2017.

- VODNAR, D.C., et.al.** Antimicrobial efficiency of edible films in food industry. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, vol. 43, no. 2, pp. 302–312. 2015.
- WANG, L., et.al.** Food Hydrocolloids Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food hydrocolloids*, vol. 32, no. 1, pp. 35–41. 2013a.
- WANG, L., et.al.** Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols. *Food Hydrocolloids*, vol. 32, no. 1, pp. 35–41. 2013b.
- WANG, L., et.al.** Synergistic antimicrobial activities of natural essential oils with chitosan films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 59, no. 23, pp. 12411–12419. 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. PHARMACEUTICALS UNIT.** Quality control methods for medicinal plant materials. *Geneva : World Health Organization*, pp. 122. 1998.
- WU, S. Der, WU, C.S. y CHEN, H.C.** Cuticle structure of squid *Illex argentinus* pen. *Fisheries Science*, vol. 69, no. 4, pp. 849–855. 2003
- XU, Y.X., KIM, K.M., HANNA, M.A. y NAG, D.** Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, vol. 21, no. 2, pp. 185–192. 2005.

ANEXOS.

Anexo A. Recolección del material vegetal.



Anexo B. Determinación del contenido de humedad de la droga cruda



Anexo C. Determinación de Cenizas totales de la droga cruda (Gráfico 1C) y determinación de cenizas solubles en agua e insolubles en ácido clorhídrico (Gráfico 2C).
















Gráfico 1C.






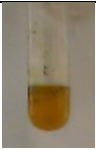




Gráfico 2C



Anexo D. Tamizaje fitoquímico.

EXTRACTO ETÉREO		EXTRACTO ACUOSO		EXTRACTO ETANÓLICO	
PRUEBA	IMAGEN	PRUEBA	IMAGEN	PRUEBA	IMAGEN
SUDAN		DRAGENDORF		BALJET	
DRAGENDORF		MAYER		RESINAS	
MAYER		WAGNER		ESPUMAS	
WAGNER		FECL3		WAGNER	
BALJET		SHINODA		CLORURO FÉRRICO	

LIEBERMANN-BURCHARD		FEHLING		SHINODA	
		ESPUMA		DRAGENDORF	
				MAYER	
				CATEQUINAS	
				BORNRANGER	

Anexo E. Preparación del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *B. andicola* (Gráfico 1E), concentración del extracto (Gráfico 2E) y filtrado y obtención del extracto concentrado (Gráfico 3E).

Gráfico 1E



Gráfico 2E.

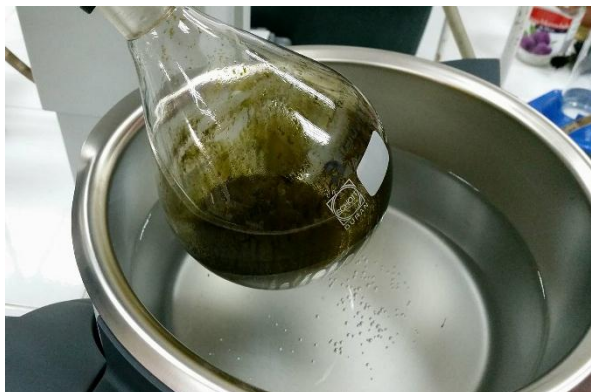


Gráfico 3E.



Anexo F. Preparación de los films de quitosano/BAHE. Mezclado de los componentes del film (Gráfico1F), Secado de los films de quitosano/BAHE (Gráfico 2F)

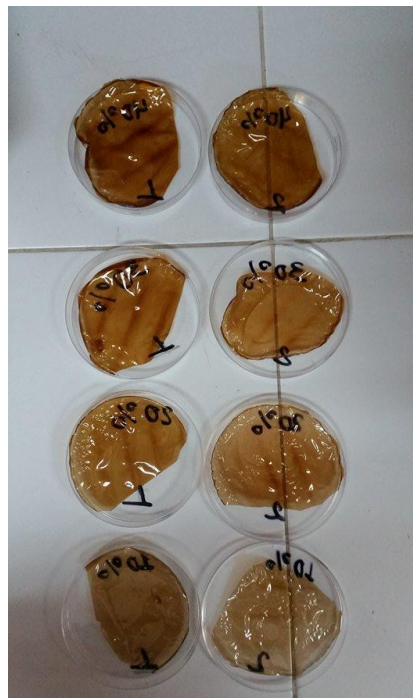
Gráfico 1F



Grafico 2F



Anexo G. Films de quitosano/BAHE



Anexo H. Espectrofotómetro con el que se realizó los análisis para la caracterización de los films (Gráfico 1H) e infrarrojo (Gráfico 2H).

Gráfico 1H

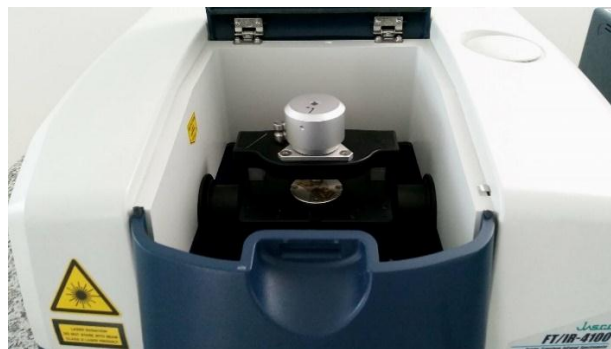
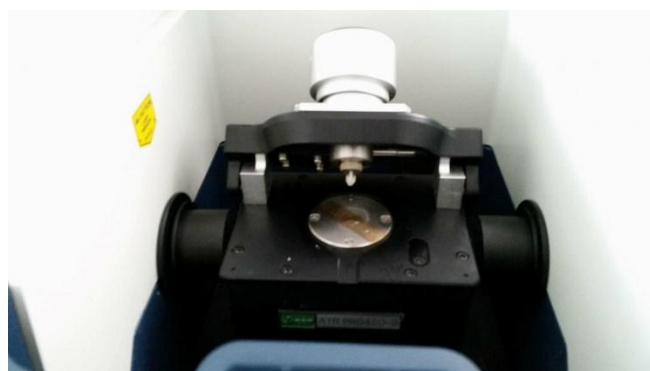


Gráfico 2H



Anexo I. Curva de calibración de ácido gálico usada para la cuantificación de fenoles (Gráfico 1I) y curva de calibración de quercetina usada para la cuantificación de flavonoides totales (Gráfico 2I).

Gráfico 1I

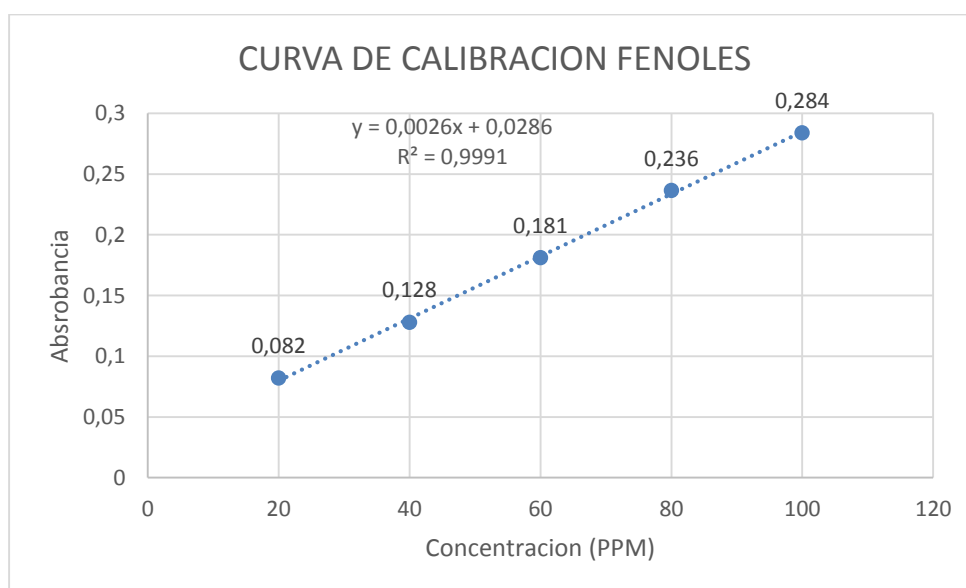
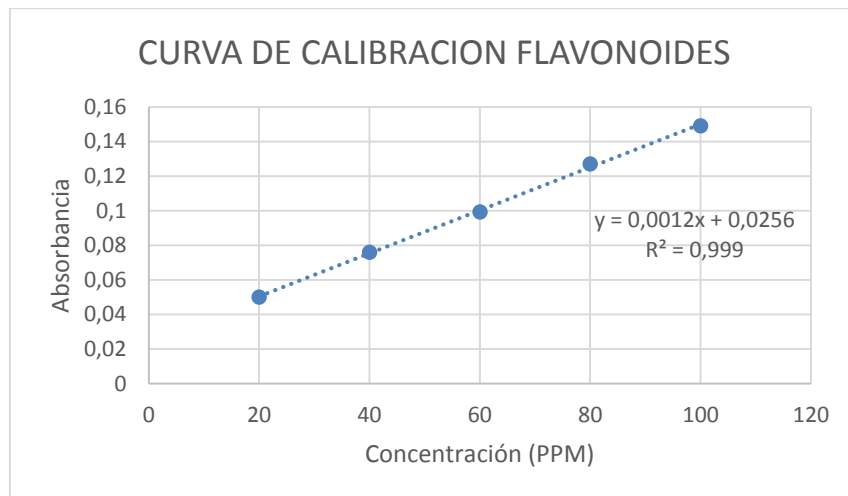
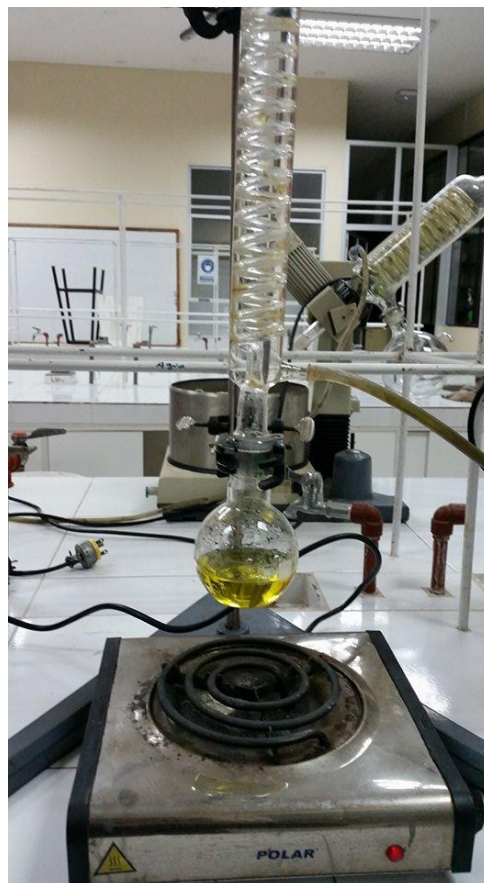


Gráfico 2I.



Anexo J. Preparación del reactivo de Folin-Ciocalteu



Anexo K. Ensayo de solubilidad de agua y contenido de humedad. Inmersión 24h en agua en agitación constante (Gráfico 1K) y secado de los films por 24h a 105° C (Gráfico 2K).

Gráfico 1K



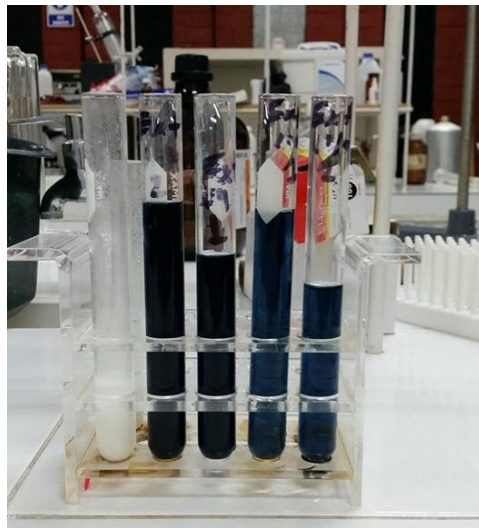
Gráfico 2K



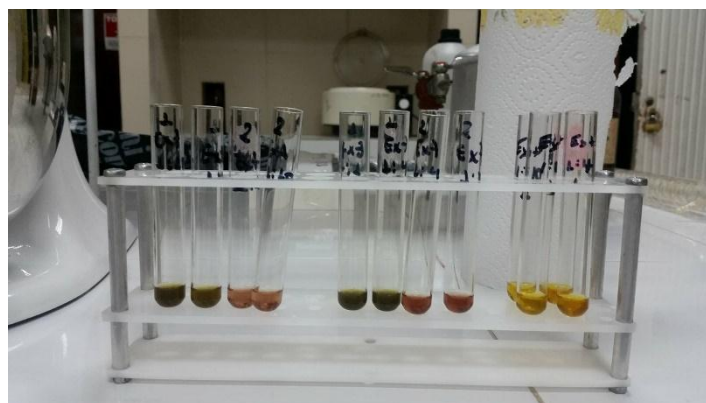
Anexo L. Ensayo de permeabilidad al vapor de agua de los films de quitosano/BAHE



Anexo M. Ensayo de contenido de fenoles totales.



Anexo N. Ensayo de contenido de flavonoides totales.



Anexo O. Ensayo de captación del radical libre DPPH



Anexo P. Análisis ANOVA de un factor de cada uno de los análisis realizados en los films de quitosano/BAHE.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Densidad	Entre grupos	,038	4	,010	75,804	,000
	Dentro de grupos	,001	10	,000		
	Total	,039	14			
Contenido de Humedad	Entre grupos	269,654	4	67,414	63,647	,000
	Dentro de grupos	10,592	10	1,059		
	Total	280,246	14			
Opacidad	Entre grupos	14,451	4	3,613	293,646	,000
	Dentro de grupos	,123	10	,012		
	Total	14,574	14			
Solubilidad en Agua	Entre grupos	95,971	4	23,993	15,863	,000
	Dentro de grupos	15,125	10	1,512		
	Total	111,096	14			
Permeabilidad al Vapor de Agua	Entre grupos	41,997	4	10,499	50,148	,000
	Dentro de grupos	2,094	10	,209		
	Total	44,091	14			
Fenoles	Entre grupos	148560,120	4	37140,030	1202,382	,000
	Dentro de grupos	308,887	10	30,889		
	Total	148869,007	14			
Flavonoides	Entre grupos	48914,799	4	12228,700	1202,435	,000
	Dentro de grupos	101,700	10	10,170		
	Total	49016,499	14			
DPPH	Entre grupos	12466,658	4	3116,665	313,428	,000
	Dentro de grupos	99,438	10	9,944		
	Total	12566,096	14			

Anexo Q. Análisis de Múltiples Rangos de Duncan para diferenciar los diferentes subconjuntos de grupos en cada uno de los análisis realizados a los films de quitosano/BAHE. Densidad (Gráfico 1P), Contenido de Humedad (Gráfico 2P), Opacidad (Gráfico 3P), Solubilidad en agua (Gráfico 4P), Permeabilidad al vapor de agua (Gráfico 5P), Contenido de fenoles totales (Gráfico 6P), Contenido de flavonoides totales (Gráfico 7P), Capacidad de captación del radical libre DPPH (Gráfico 8P).

Gráfico 1Q

Densidad

Duncan^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	1,0726			
10	3		1,1530		
20	3		1,1550		
30	3			1,1888	
40	3				1,2247
Sig.		1,000	,833	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráfico 2Q

Contenido_Humedad

Duncan^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
10	3	32,1034		
40	3		34,0651	
30	3		35,4075	
20	3		35,6782	
0	3			44,4303
Sig.		1,000	,096	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráfico 3Q

Opacidad

Duncan^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	,7302				
10	3		2,2442			
20	3			2,4632		
30	3				3,0674	
40	3					3,6489
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráfico 4Q

Solubilidad_Agua

Duncan^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
20	3	12,7550			
10	3	13,2768	13,2768		
30	3		15,4539	15,4539	
40	3			16,3874	
0	3				19,8279
Sig.		,615	,055	,374	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráfico 5Q

Permeabilidad_Vapor_Agua

Duncan^a

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
40	3	2,4966		
30	3	3,0400	3,0400	
20	3	3,2394	3,2394	
10	3		3,4141	
0	3			7,1591
Sig.		,086	,362	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráfico 6Q

Fenoles

Duncan^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	1,2833				
10	3		165,6923			
20	3			208,7692		
30	3				261,8462	
40	3					279,5385
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráfico 7Q

Flavonoides

Duncan^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	,7333				
10	3		95,0742			
20	3			119,7918		
30	3				150,2473	
40	3					160,3992
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

Gráfico 8Q

DPPH

Duncan^a

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
0	3	3,1267		
10	3		55,3051	
20	3		60,9724	
30	3			81,5116
40	3			82,1886
Sig.		1,000	,052	,798

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

