



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

**“FORMULAR UN BIOPLÁSTICO BASADO EN QUITOSANO CON
ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**

TRABAJO DE TITULACIÓN
TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

AUTORA: JESSICA LISBETH MONAR LÓPEZ
TUTOR: BQF. DIEGO VINUEZA TAPIA, M.Sc.

Riobamba-Ecuador

2017

©2017, Jessica Lisbeth Monar López

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 tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“FORMULAR UN BIOPLÁSTICO BASADO EN QUITOSANO CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE”**, de responsabilidad de la señorita Jessica Lisbeth Monar López, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

BQF. Diego Vinueza, M.Sc.

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

BQF. Gisela Pilco, M.Sc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Yo, Jessica Lisbeth Monar López, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 15 de diciembre de 2017

Jessica Lisbeth Monar López
120513400-8

DEDICATORIA

A papito Dios por darme la valentía para seguir adelante a pesar de muchos obstáculos que me impedían estudiar.

A mis padres Eduardo y María Elena, a mis hermanos Julio, Paúl y Diego quienes siempre estuvieron pendientes de mí con su apoyo incondicional, sus consejos, su paciencia dándome fuerzas y amor día a día.

A mi hermana Vicky quien no ha estado conmigo durante los años de estudio, pero siempre desde lejos estuvo pendiente de mí.

A mis mascotas que cada día lo único que han hecho es darme amor y felicidad con sus travesuras.

A mi novio, amigos y demás familiares quienes estuvieron siempre conmigo dándome ánimos.

Para ustedes porque son lo mejor y más valioso que Dios me ha dado.

Jessica.

AGRADECIMIENTO

En primera instancia agradezco a Dios y a mis padres personas de gran sabiduría que se han esforzado por ayudarme a cumplir una meta más, apoyándome y respetando cada una de las decisiones tomadas a lo largo de la carrera.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y a los docentes por sus enseñanzas, a mi director de tesis BQF. Diego Vinueza a quien admiro mucho y al miembro del tribunal de tesis BQF. Gisela Pilco, quienes siempre me dedicaron su valioso tiempo en cada etapa del proyecto de investigación.

A mi novio, amigos y demás familiares los cuales siempre me brindaron su cariño, tiempo y comprensión.

Esto es posible gracias a ustedes. Dios los bendiga siempre.

Jessica.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xvi
SUMMARY	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO	5
1.1. <i>Justicia chlorostachya</i> Leonard.....	5
1.1.1. <i>Cuidados y cultivo.</i>	5
1.1.2. <i>Usos Etnobotánicos.</i>	6
1.1.3. <i>Composición química y actividad farmacológica del género Justicia.</i>	6
1.2. Compuestos fenólicos.	7
1.2.1. <i>Características químicas generales de los fenoles.</i>	7
1.2.2. <i>Flavonoides.</i>	8
1.3. Descripción general de los antioxidantes.	8
1.4. Quitina.	9
1.4.1. <i>Quitosano.</i>	9
1.5. Producción / procesamiento de quitina y quitosano.	10
1.6. Propiedades generales del quitosano.	12
1.6.1. <i>Propiedades químicas.</i>	12
1.6.2. <i>Propiedades biológicas.</i>	12
1.7. Definición de bioplásticos.	14
1.7.1. <i>Clasificación de los bioplásticos.</i>	15
1.8. Materiales para empaques en alimentos.	16
1.8.1. <i>Bioplásticos procedentes de recursos renovables.</i>	16
1.8.1.1. <i>Polímeros renovables provenientes directamente de organismos vivos.</i>	16
1.8.1.2. <i>Bioplásticos que requieren ser sintetizados (procedencia: recurso renovable)..</i> 16	
1.8.2. <i>Plásticos derivados del petróleo</i>	16

1.9.	Bioplásticos a base de quitosano.....	17
<i>1.9.1.</i>	<i>Descripción de los compuestos utilizados para elaborar bioplásticos.....</i>	<i>17</i>
CAPÍTULO II		
2.	MARCO METODOLÓGICO	19
2.1.	Lugar de la investigación.....	19
2.2.	Recolección de la especie vegetal.	19
2.3.	Materiales, equipos y reactivos.	19
<i>2.3.1.</i>	<i>Especie vegetal.</i>	<i>19</i>
<i>2.3.2.</i>	<i>Materiales.....</i>	<i>19</i>
<i>2.3.3.</i>	<i>Equipos.....</i>	<i>21</i>
<i>2.3.4.</i>	<i>Reactivos.....</i>	<i>22</i>
2.4.	Técnicas y métodos.	23
<i>2.4.1.</i>	<i>Proceso de limpieza, secado y molienda de la especie vegetal.....</i>	<i>23</i>
<i>2.4.2.</i>	<i>Determinación de los parámetros de control de calidad de la especie vegetal..</i>	<i>23</i>
<i>2.4.2.1.</i>	<i>Determinación del contenido de humedad.....</i>	<i>23</i>
<i>2.4.2.2.</i>	<i>Determinación de cenizas totales.</i>	<i>24</i>
<i>2.4.2.3.</i>	<i>Determinación de cenizas solubles en agua.</i>	<i>25</i>
<i>2.4.2.4.</i>	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.</i>	<i>26</i>
2.4.3.	Tamizaje Fitoquímico.	26
<i>2.4.3.1.</i>	<i>Ensayo de Sudán.....</i>	<i>28</i>
<i>2.4.3.2.</i>	<i>Ensayo de Dragendorff.....</i>	<i>29</i>
<i>2.4.3.3.</i>	<i>Ensayo de Mayer.....</i>	<i>29</i>
<i>2.4.3.4.</i>	<i>Ensayo de Wagner.</i>	<i>29</i>
<i>2.4.3.5.</i>	<i>Ensayo de Baljet.</i>	<i>29</i>
<i>2.4.3.6.</i>	<i>Ensayo de Borntrager.....</i>	<i>30</i>
<i>2.4.3.7.</i>	<i>Ensayo de Liebermann-Burchard.....</i>	<i>30</i>
<i>2.4.3.8.</i>	<i>Ensayo de Catequinas.....</i>	<i>30</i>
<i>2.4.3.9.</i>	<i>Ensayo de resinas.</i>	<i>30</i>
<i>2.4.3.10.</i>	<i>Ensayo de Fehling.....</i>	<i>31</i>

2.4.3.11.	<i>Ensayo de la espuma.....</i>	31
2.4.3.12.	<i>Ensayo de cloruro férrico.</i>	31
2.4.3.13.	<i>Ensayo de Shinoda.....</i>	31
2.4.3.14.	<i>Ensayo de antocianidinas.</i>	32
2.4.3.15.	<i>Ensayo de mucilagos.....</i>	32
2.4.3.16.	<i>Ensayo de principios amargos y astringentes.....</i>	32
2.4.4.	<i>Preparación del extracto hidroalcohólico de Justicia chlorostachya L.</i>	32
2.4.5.	<i>Control de calidad del extracto hidroalcohólico.</i>	32
2.4.5.1.	<i>Requisitos organolépticos.</i>	32
2.4.5.2.	<i>Determinación de la densidad relativa.</i>	33
2.4.5.3.	<i>Índice de refracción.</i>	33
2.4.5.4.	<i>Medición del pH.....</i>	34
2.4.5.5.	<i>Determinación de sólidos totales.</i>	34
2.4.6.	<i>Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu.</i>	35
2.4.7.	<i>Cuantificación de flavonoides totales.....</i>	35
2.5.	<i>Preparación de los bioplásticos.....</i>	36
2.5.1.	<i>Pruebas para determinar la calidad del bioplástico.....</i>	37
2.5.1.1.	<i>Análisis por Espectroscopía Infrarroja.</i>	37
2.5.1.2.	<i>Densidad.</i>	37
2.5.1.3.	<i>Espesor.....</i>	37
2.5.1.4.	<i>Contenido de humedad.</i>	37
2.5.1.5.	<i>Opacidad.....</i>	38
2.5.1.6.	<i>Solubilidad en agua.</i>	38
2.5.1.7.	<i>Permeabilidad al vapor de agua.....</i>	38
2.5.1.8.	<i>Contenido total de compuestos fenólicos en el bioplástico.</i>	39
2.5.1.9.	<i>Capacidad de captación de radicales libres mediante DPPH.....</i>	40
CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	41

3.1.	Parámetros de control de calidad del extracto de la especie vegetal	41
3.2.	Tamizaje fitoquímico	42
3.3.	Control de calidad del extracto hidroalcohólico	43
3.4.	Cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu del extracto.....	44
3.5.	Cuantificación de flavonoides del extracto	45
3.6.	Determinación de la calidad de los bioplásticos	46
3.6.1.	<i>Análisis Infrarrojo</i>	<i>46</i>
3.6.2.	<i>Caracterización de opacidad, densidad y contenido de humedad.</i>	<i>47</i>
3.6.3.	<i>Solubilidad en agua</i>	<i>49</i>
3.6.4.	<i>Permeabilidad al vapor de agua</i>	<i>50</i>
3.6.5.	<i>Contenido fenólico total de los bioplásticos</i>	<i>52</i>
3.6.6.	<i>Cuantificación de flavonoides en los bioplásticos.</i>	<i>53</i>
3.6.7.	<i>Determinación de la actividad antioxidante de los bioplásticos.....</i>	<i>54</i>
	CONCLUSIONES.....	56
	RECOMENDACIONES.....	57
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica.	5
Tabla 2-1: Principales aplicaciones del quitosano.	13
Tabla 3-1: Componentes utilizados para la elaboración de bioplásticos.	17
Tabla 1-2: Materiales de laboratorio utilizados.	19
Tabla 2-2: Equipos utilizados en las distintas técnicas.	21
Tabla 3-2: Reactivos utilizados en cada técnica.	22
Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de la especie vegetal.	41
Tabla 2-3: Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de <i>Justicia chlorostachya</i> L.	42
Tabla 3-3: Determinación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de 43	43
Tabla 4-3: Resultado de la cuantificación de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de <i>Justicia chlorostachya</i> L.	44
Tabla 5-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de <i>Justicia chlorostachya</i> L.	45
Tabla 6-3: Resultados obtenidos de opacidad, densidad y contenido de humedad de los bioplásticos.	47
Tabla 7-3: Resultados de la solubilidad en agua de los bioplásticos a diferentes concentraciones de extracto de <i>Justicia chlorostachya</i> L.	49
Tabla 8-3: Resultados de la permeabilidad al vapor de agua de los bioplásticos a diferentes concentraciones de extracto de <i>Justicia chlorostachya</i> L.	50
Tabla 9-3: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos de los bioplásticos.	52
Tabla 10-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides de los bioplásticos.	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: <i>Justicia chlorostachya</i> L.	5
Figura 2-1: Estructuras moleculares de (a) quitina y (b) quitosano.	10
Figura 3-1: Procesos químicos para la obtención de quitina, quitosano y los oligómeros de quitina / quitosano (COS).	11
Figura 4-1: Clasificación de los bioplásticos.	15
Figura 1-2: Esquema para elaborar los extractos para el Tamizaje Fitoquímico.	27
Figura 2-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.	28
Figura 3-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.	28
Figura 4-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.	28
Figura 5-2: Esquema para la elaboración de los bioplásticos.	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Espectro IR de los bioplásticos.....	46
Gráfico 2-3: Solubilidad en agua de los bioplásticos.....	49
Gráfico 3-3: Permeabilidad al vapor de agua de los bioplásticos	51
Gráfico 4-3: Contenido fenólico total del bioplástico en función del tiempo.....	52
Gráfico 5-3: Contenido de flavonoides del extracto del bioplástico en función del tiempo.	54
Gráfico 6-3: Porcentaje de la actividad de captación de radicales libres en función del tiempo.	55

INDICE DE ANEXOS

Anexo A : Selección, limpieza secado y molienda de la especie vegetal *Justicia chlorostachya*

Anexo B: Obtención de los extractos

Anexo C: Control de calidad de la materia prima

Anexo D: Tamizaje Fitoquímico

Anexo E: Métodos generales para el análisis de extractos

Anexo F: Determinación de compuestos fenólicos del extracto de *Justicia chlorostachya* L.

Anexo G: Elaboración de los bioplásticos

Anexo H: Pruebas para determinar la calidad del bioplástico.

Anexo I: Preparación de la solución de extracto del bioplástico

Anexo J: Determinación del contenido fenólico, flavonoides y la actividad antioxidante.

Anexo K: Análisis espectroscópico de los bioplásticos

Anexo L: Medición de grosor y absorbancia de los bioplásticos.

Anexo M: Resultados de la permeabilidad al vapor de agua.

Anexo N: Análisis estadístico de los parámetros de control de calidad de los bioplásticos

GLOSARIO

ROS o EROS = Especies reactivas de oxígeno

BPA = Bisfenol-A

UV = Ultravioleta

IR = Infrarrojo

GlcNAc = N-Acetil-glucosamina

α = alfa

β = beta

γ = gamma

DD = Desacetilación

BPL = Bioplásticos

PLA = Ácido poliláctico

PHA = Polihidroxialcanoatos

PE = Polietileno

PO = Polipropileno

CO₂ = Dióxido de carbono

rpm = Revoluciones por minuto

ppm = Parte por millón

g = Gramo

mg = Miligramo

mm = Milímetro

cm = Centímetro

nm = Nanómetro

μL = Microlitro

kPa = Kilopascal

NaNO₂ = Nitrito de sodio

AlCl₃ = Cloruro de Aluminio

NaOH = Hidróxido de sodio

CaCl₂ = Cloruro de calcio

NaNO₃ = Nitrato de sodio

KNO₃ = Nitrato de potasio

HR = Humedad relativa

WS = Solubilidad en agua

WVP = Permeabilidad al vapor de agua.

DPPH = 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

RESUMEN

Se elaboró un bioplástico basado en quitosano con actividad antioxidante, enriquecido con el extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya* Leonard a diferentes concentraciones. Los bioplásticos fueron elaborados a partir de una solución de quitosano 2% p/v a la que fue añadido glicerol 30% como plastificante, después se adicionaron diferentes concentraciones de extracto (10%, 20%, 30% y 40%). Las soluciones de bioplástico se distribuyeron en cajas Petri y se secaron a 50°C y humedad relativa (HR) 25%. Los bioplásticos se mantuvieron en un recipiente hermético a temperatura ambiente y HR 73% durante 48 h antes de su análisis. Fueron evaluados los contenidos de compuestos fenólicos y flavonoides totales del extracto hidroalcohólico y de los bioplásticos elaborados. Se ensayó la actividad captadora de radicales libres mediante el método (DPPH). Mediante Espectroscopía IR, fueron investigadas las interacciones entre el quitosano y componentes del extracto. Las propiedades fisicoquímicas de los bioplásticos como densidad, contenido de humedad, opacidad, solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua fueron determinadas. Se detectaron interacciones entre el quitosano y los compuestos fenólicos verificadas por cambios en los picos del espectro IR. El bioplástico con mejores propiedades fue el formulado con 40% de concentración de extracto, con las siguientes propiedades: contenido de humedad $27,16 \pm 0,695\%$, solubilidad en agua WS = $16,62 \pm 0,59\%$ y permeabilidad al vapor de agua WVP = $3,02 \text{ g mm/m}^2 \text{ día kPa}$, respectivamente. Además, presentó una cantidad considerable de fenoles totales $274,15 \pm 4,62 \text{ mg GAE / g}$ de bioplástico y de flavonoides $46,16 \pm 1,76 \text{ mg QE / g}$ de bioplástico. La actividad antioxidante de los bioplásticos declinó con el tiempo. Los resultados sugieren que la incorporación del extracto en la solución formadora del bioplástico tiene una influencia positiva para considerarlos como una alternativa viable para usarlos como materiales de empaque. Se recomienda un estudio microbiológico.

Palabras Clave: <BIOQUÍMICA>, <FARMACOLOGÍA>, <INSULINA (*Justicia chlorostachya* L.)>, <EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO>, <QUITOSANO>, <GLICEROL>, <COMPUESTOS FENÓLICOS>, <ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE>.

SUMMARY

The present research was carried out with objective for elaborating a bioplastic-based chitosan with antioxidant activity, enriched with the hydroalcoholic extract from *Justicia chlorostachya* Leonard at different concentrations. The bioplastics were made from a solution of 2% w/v chitosan (weight / volume) to which 30% as plasticizer, then different concentrations of extract were added (10%, 20%, 30% and 40%) glycerol was added. The bioplastic solutions were distributed in Petri boxes and dried them at 50°C and relative humidity RH (Relative Humid) 25%. The bioplastic solutions were kept in an airtight container 73% HR for 48 hours before their analysis. The contents of phenolic compounds and total flavonoids hydroalcoholic extract and of elaborated bioplastics were evaluated. The free radical scavenging activity was assayed by the method (DPPH). Through IR Spectroscopy, the interactions between chitosan and extract components were investigated. The physicochemical properties of bioplastics such as density, moisture content, opacity, water solubility and water vapor permeability were determined. Interactions between chitosan and phenolic compounds verified by changes in peaks of IR spectrum were detected. The bioplastic with the best properties was formulated with 40% concentration of extract, with the following properties contained was humidity $27,16 \pm 0,695\%$, solubility in water $WS= 16,62 \pm 0,59\%$ and permeability to water value $WVP= 3,02 \text{ g mm/m}^2 \text{ kPa day}$, respectively. In addition, it presented a considerable amount of total phenols $274,15 \pm 4,62 \text{ mg GAE / g}$ of bioplastic and flavonoids $46,16 \pm 1,76 \text{ mg QE /g}$ of bioplastic. The antioxidant activity of bioplastics declined over time. The results suggest that the incorporation of extract in the bioplastics forming solution has a positive influence to consider them as a viable alternative to use them as packing materials. A microbiological study is recommended.

Keywords: <BIOCHEMISTRY>, <PHARMACOLOGY>, <INSULIN (*Justicia chlorostachya* L.)>, <HYDROALCOHOLIC EXTRACT>, <CHITOSAN>, <GLYCEROL>, <PHENOLIC COMPOUNDS>, <ANTIOXIDANT ACTIVITY>.

INTRODUCCIÓN

La pregunta de investigación que motivó el presente trabajo fue: ¿Es posible formular un bioplástico basado en quitosano que posea adicionalmente actividad antioxidante?

La tendencia de la investigación académica en cuanto a formular bioplásticos basados en quitosano con actividad antioxidante enriquecido con extracto de *Justicia chlorostachya* Leonard, se centra en mejorar la seguridad de los alimentos; así como, ampliar el campo de aplicaciones potenciales del quitosano y contribuir a la solución del problema de contaminación ambiental.

Actualmente los consumidores demandan productos frescos. Se conoce que debido a la oxidación de grasas y aceites son generadas especies reactivas de oxígeno (ROS) que incluyen a los radicales libres, estando asociadas a la aparición de varias enfermedades como el envejecimiento, cáncer, arterioesclerosis, diabetes, y artritis reumatoide; por lo que, es fundamental utilizar agentes antioxidantes que protejan el organismo del ser humano de los radicales libres (Liu *et al.*, 2016, p.518).

La conservación de los alimentos depende del material de recubrimiento de los plásticos, los cuales han modificado la producción y consumo de los alimentos en la población. El tiempo de degradación de los plásticos sintéticos “convencionales” se ha estimado puede llegar a ser hasta de 500 años, en comparación con la descomposición de productos orgánicos que pueden llegar a degradarse en 3 o 4 semanas. (Villalón *et al.*, 2016, p.218). El uso masivo de plásticos convencionales ha provocado acumulación de aquellos en ríos, mares, carreteras, etc. Además, en ciertas condiciones pueden ser reducidos en su tamaño llegando a dimensiones inferiores a 5 milímetros, luego de los animales lo ingieren se verifica la muerte de miles de aves y mamíferos marinos al año debido a su causa. (Cáceres, 2015a: p.1) (Lebreton *et al.*, 2017, p.2).

Se conoce que aditivos químicos como el bisfenol-A (BPA) que se usa como endurecedor de algunos tipos de plásticos (especialmente plásticos derivados del petróleo) y recubrimiento tanto exterior como interior de los recipientes para alimentos pueden llegar a los alimentos por medio del contacto de los envases de policarbonato que liberan el BPA hacia aquellos por su uso constante, siendo uno de los principales problemas de este componente. (Healy *et al.*, 2015, p.1)

Los ftalatos, bisfenol-A y, otros componentes de los plásticos convencionales, son potentes disruptores endócrinos. Los disruptores endócrinos/hormonales son sustancias químicas que tienen capacidad de provocar disfunciones hormonales que afectan a la fertilidad, el crecimiento, el metabolismo, el sistema inmunitario y se ha demostrado que son cancerígenos (García *et al.*, 2012, pp.262-265).

Por lo tanto, el uso de materiales biodegradables es de gran importancia para el desarrollo sostenible. Los materiales más utilizados para elaborar bioplásticos son polisacáridos, proteínas, y compuestos lipídicos derivados de recursos vegetales y animales (Liu *et al.*, 2017a: p.457). Entre los diversos polisacáridos usados en la elaboración de “bioplásticos” se ha encontrado que el quitosano tiene características que lo convierten en un importante recurso biodegradable, biofuncional, y biocompatible; igualmente, varios investigadores señalan en sus reportes que tiene actividades antimicrobianas y antifúngicas (Aider, 2010, p.837).

El quitosano es uno de los polímeros más comunes en la naturaleza, al ser soluble en soluciones ácidas, el quitosano se fabrica fácilmente en diferentes formas de interés tecnológico, dependiendo de la aplicación, tales como bioplásticos, microesferas, nanoesferas (Aranaz *et al.*, 2016, pp.1-4).

Asimismo, el quitosano tiene propiedades antioxidantes y al no ser tóxico es aplicable en biomedicina, administración de fármacos, tratamiento de aguas residuales, y tiene buenas propiedades de formación de plástico, por lo cual ha sido ampliamente utilizado para la producción de bioplásticos para envases de alimentos (Liu *et al.*, 2017b: pp.457-458). Sin embargo, el quitosano tiene algunas desventajas y requiere de más desarrollo para conseguir los resultados específicos de eficiencia necesaria.

El beneficio de incorporar diferentes compuestos/componentes al quitosano es que aquel aumenta las propiedades deseadas del producto final. Los compuestos fenólicos están abundantemente dispersos en todo el reino vegetal y son sintetizados por las plantas durante su desarrollo y en respuesta a condiciones como infecciones, radiación UV, etc. (Stalikas, 2007a: pp.328-329). Con el fin de aumentar o mejorar las propiedades de los plásticos a base de quitosano tales como las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y/o mecánicas, existen estudios en donde se incorporan diversos compuestos activos tales como aceites esenciales de albahaca y tomillo (Aljawish *et al.*,2016, pp.551-552). La ventaja de incluir compuestos fenólicos en el quitosano es que pueden conferir las propiedades señaladas anteriormente (Curcio *et al.*, 2009, pp. 5933).

Este estudio cumple con el objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir, que es mejorar la calidad de vida de la población cuidando el hábitat que debe ser ambientalmente sano y brindando condiciones de seguridad evitando posibles riesgos para la salud de la población (Senplades, 2013, pp 135-137).

La investigación tuvo como objetivo formular un bioplástico basado en quitosano con actividad antioxidante, incorporando el extracto hidroalcohólico total de *Justicia chlorostachya* Leonard, con el fin de crear un producto de empaque que además de su utilidad en la vida diaria sea amigable con el medio ambiente, con el valor añadido de protección a los alimentos de la degradación por su propiedad antioxidante.

Este documento escrito de la investigación está compuesto por los siguientes componentes:

En el capítulo I, se incluye un marco teórico que responde a las preguntas epistemológicas en cuanto a los temas de interés sobre: *Justicia chlorostachya* L.; por otra parte, se teoriza sobre actividad antioxidante, quitosano y sus aplicaciones. Para lo que se ha realizado una búsqueda bibliográfica extensiva de artículos científicos y libros.

En el capítulo II, se presenta la metodología de investigación para alcanzar los objetivos propuestos.

En el capítulo III, se registra el marco de resultados, discusión y análisis de resultados.

En la parte final del trabajo de titulación se presentan las conclusiones en relación a los objetivos resultados e hipótesis; se incluye un apartado de recomendaciones oportunas al tema. La bibliografía ha sido extraída de artículos científicos y libros relacionados con las variables de investigación.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Formular un bioplástico basado en quitosano con actividad antioxidante.

Objetivos específicos:

- Investigar las interacciones potenciales entre el quitosano y los componentes del extracto hidroalcohólico total de *Justicia chlorostachya* Leonard en el bioplástico mediante espectroscopía infrarroja.
- Caracterizar la densidad, contenido de humedad y opacidad del bioplástico mediante pruebas fisicoquímicas.
- Determinar la solubilidad en agua y pérdida de agua del bioplástico mediante gravimetría.
- Evaluar el contenido de fenoles y flavonoides presentes en el bioplástico mediante métodos colorimétricos.
- Evaluar la actividad antioxidante del bioplástico mediante la prueba de captación de radicales libres.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Justicia chlorostachya* Leonard.



Figura 1-1: *Justicia chlorostachya* L.

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Tabla 1-1: Clasificación Taxonómica.

Clasificación Taxonómica	
Nombre Científico	<i>Justicia chlorostachya</i>
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Scrophulariales
Familia	Acanthaceae
Género	<i>Justicia</i>
Epíteto Específico	<i>Chlorostachya</i>
Autor Epíteto Específico	Leonard

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Fuente: (Monge, 2015a : p.8)

1.1.1. *Cuidados y cultivo.*

Bosque húmedo tropical con clima que oscila entre los 19°C a 20°C, que reúna las condiciones adecuadas para que la especie pueda residir y reproducirse. Algunas especies que se encuentran en proceso de multiplicación deben estar en los viveros forestales e invernaderos. (Narváez, 2009, pp.42-46)

La exposición del sol, no debe ser directa a la planta a partir del final de la floración hasta que aparezca la nueva vegetación. A la planta en crecimiento activo se le deberá aplicar cada 2 semanas un fertilizante líquido.

Para su conservación regularmente se debe “cortar las yemas terminales para que la planta siga arbustiva; reemplazar por un brote arraigado cuando se esparza, por lo general después de 2 años. Para cultivar esta especie es mejor en primavera mediante estancamiento de los tallos”. (Pazmiño, 2011a : pp.26-27).

1.1.2. Usos Etnobotánicos.

El género *Justicia* corresponde a la familia Acanthaceae que consta de más de 600 especies exploradas. “Este género también es reconocido como Jacobinia e incluye a plantas perennes nativas de América tropical de hojas ovaladas color verde, nervios bien marcados y flores tubulares de color rosa, naranjas y rojo pálido” (Pazmiño, 2011b: p.25).

Desde tiempos prehispánicos se utilizaba esta planta para tratar problemas como “sarna, flujo menstrual, disentería y como estimulante; en la actualidad, en comunidades indígenas tiene un uso ritual el cual consiste en macerar la planta y bañar a un niño a los 7 días de nacido; los demás asistentes también deben realizarlo” (Pazmiño, 2011c: p.25).

También es usada por los chamanes. “Las hojas de esta hierba son hervidas con los tallos de *Banisteriopsis caapi* para preparar Ayahuasca. La mezcla con esta hierba no intensifica los efectos alucinógenos de esta bebida, pero se dice que disminuye el sabor amargo. Las personas que son desobedientes o hablan malas palabras, se les friega la boca con las hojas de esta planta cuando la luna llena está en el ocaso” (Rios *et al.*, 2007, p.401).

Igualmente, en forma de cocción se registra su uso para enfermedades de carácter pulmonar como neumonías, sin descartar el empleo de esta especie vegetal en tratamientos como la diabetes llegando a formar un ente de atención en los últimos tiempos; por lo que la *Justicia chlorostachya* Leonard es conocida como insulina vegetal en la Amazonia Ecuatoriana (Monge, 2015b: pp.7-8).

1.1.3. Composición química y actividad farmacológica del género Justicia.

Entre los componentes principales del género *Justicia* se han identificado “lignanós y saponinas con posibles efectos inhibidores de la fertilidad en las mujeres. La naftalida un lignano ha sido

asociado con actividad antidepresiva y antiarrítmica. En algunas especies se han aislado aminas aromáticas, kaempferol, esteroides, ácido salicílico, aceites esenciales y alcoholes alifáticos” (Pazmiño, 2011d: pp.66-67).

Los análisis preliminares de *Justicia pectoralis* demuestran “la presencia de esteroides, mucílagos y un aceite esencial. La actividad hipoglicémica de *Justicia chlorostachya* L. es alta, por la presencia de compuestos fenólicos tipo flavonoides, la cual disminuiría los problemas vasculares degenerativos ocasionados por las EROS, provenientes de las múltiples reacciones de oxidación derivadas de un metabolismo imparcial de la glucosa a nivel sistémico-somático” (Pazmiño, 2011e: pp.66-67).

1.2. Compuestos fenólicos.

Son uno de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia se debe a que las especies herbívoras del reino animal se alimentan de estas. Es importante mencionar que “los fenoles actúan como fitoalexinas” (Stalikas, 2007b: pp.3268-3270) es decir las plantas con heridas secretan compuestos fenólicos para su defensa fúngica o bacteriana; además, los fenoles favorecen a la pigmentación de varias partes de las plantas, por ejemplo los antocianos dan color a las cortezas de hortalizas, frutas, etc.

Los compuestos fenólicos están dispersos en todo el reino vegetal, aproximadamente hay 8000 estructuras fenólicas diferentes, siendo sintetizados por las plantas en periodo de desarrollo y actúan frente a condiciones como radiación UV, infecciones, entre otras (Stalikas, 2007c: pp.3268-3270).

1.2.1. Características químicas generales de los fenoles.

Lo que más destaca de los fenoles son sus propiedades antioxidantes, por una parte, son susceptibles a ser oxidados, y por otra imposibilitan que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Lo que les otorga características especiales con relación a los demás alcoholes esto se debe a que los “grupos hidroxilos, al estar unidos a un anillo aromático, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interactúe con los electrones del anillo” (Creus, 2004a: p.82).

También los fenoles pueden actuar como quelantes formando complejos con metales di o trivalentes, especialmente con aluminio y hierro, lo que puede tener importancia nutricional (Creus, 2004b: p.82).

En el anillo aromático los compuestos fenólicos simples tienen dos (en las posiciones 1,2, 1,3 o 1,4) o tres (en las posiciones 1, 3,5 o 1, 2,3) grupos hidroxilo (Peñarrieta *et al.*, 2014 a : pp.68-69).

Los polifenoles en la dieta diaria otorgan beneficios para la salud, incluidas sus propiedades antioxidantes, efectos antiinflamatorios, actividades antialérgicas, anti-proliferativas, antitrombóticas y antihipertensivas; también, se ha determinado que confiere actividades antibacteriana, antiviral y antifúngica (Fernández *et al.*,2017 pp:118-119).

El término biofenol se estableció para sustituir el término de uso común que es “Polifenol”. Esto es porque el prefijo 'poli' crea una inapropiada impresión de naturaleza polimérica. Últimamente, la palabra que se usa es biofenoles a la que se definió como “compuestos fenólicos aislados de tejidos de plantas y metabolitos”. En general, los biofenoles se pueden dividir en grupos distintos como ácidos fenólicos, lignanos, flavonoides, entre otros (Sied *et al.*, 2017, pp.3-5).

1.2.2. Flavonoides.

El término flavonoide viene del latín “flavus”, que significa amarillo. Los flavonoides son un tipo particular de los polifenoles presentes en plantas y son responsables de la coloración de frutas y flores (Peñarrieta *et al.*,2014b:pp.71-73). Además, los flavonoides tienen acción beneficiosa sobre la salud.

Los flavonoides se identifican por una estructura de quince carbonos, la estructura contiene benzo- γ -pirona y un anillo fenólico. Estos se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, entre las principales se encuentran las antocianinas, flavonoles, flavonas y están estrechamente relacionados con los taninos (Ávalos y Elena, 2009, pp.133-134).

Los flavonoides actúan primariamente como antioxidantes. La función antioxidante de los flavonoides depende especialmente de su capacidad de reducir radicales libres y complejar metales.

1.3. Descripción general de los antioxidantes.

Un antioxidante es una molécula apta para prevenir la oxidación de otras moléculas. Siendo, la oxidación una reacción química para transferir electrones de una sustancia a un agente oxidante (Llacuna y Mach, 2013,pp.16-17). Asimismo, las reacciones de oxidación pueden originar radicales

libres que posteriormente inician reacciones en cadena que finalmente dañan las células (Valls, 2009a: pp.3-4).

A nivel bioquímico la defensa antioxidante puede ser tanto enzimática como no enzimática. En el sistema no enzimático las células utilizan una serie de compuestos antioxidantes como son Vitamina E, Vitamina C, ferritina, ácido úrico y flavonoides (Valls, 2009b: pp.3-4).

Las reacciones en cadena de radicales libres dentro de un material pueden ser inhibidas por la adición de productos químicos (antioxidantes preventivos) y retardar la formación de radicales libres o implantando sustancias (antioxidantes de cadena) que compitan por los radicales existentes y los elimine del medio de reacción (Se-kwon, 2011a: p.207).

1.4. Quitina.

La quitina es un polisacárido catiónico compuesto por N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc, 2-acetamido-2-desoxi-d-glucosa) con enlaces glicosídicos β (1 \rightarrow 4) entre cada monómero (Figura 2-1 a). La quitina se encuentra en 3 formas polimórficas de estado sólido y son α , β y γ , se diferencian en su grado de hidratación, tamaño de la celda y número de cadenas de quitina por celda unitaria (Se-kwon, 2011b: pp.12-13).

La α -quitina se encuentra en los exoesqueletos de mariscos y en las paredes celulares de los hongos y es una de las más abundantes, la β -quitina se la encuentra especialmente en plumas de calamar y diatomeas (algas), y la γ -quitina se suele encontrar en el revestimiento del estómago de calamares y sepias (moluscos) (Se-kwon, 2011c: pp.12-13).

1.4.1. Quitosano.

El quitosano es un biopolímero compuesto por D-glucosamina (GlcN) y (GlcNAc) obtenido por desacetilación de la quitina (Figura 2-1 b). Al igual que la quitina, con enlace glicosídico β (1 \rightarrow 4) y ha sido definido como el "biomaterial más versátil de la naturaleza" (Sandford,1989; citado en Se-kwon, 2011d).

Mientras que otros polisacáridos de origen natural son de naturaleza ácida, tanto la quitina como el quitosano son básicos, por lo que se someten a las reacciones de neutralización; además, a nivel molecular, la quitina y el quitosano son semejantes, ambos poseen grupos hidroxilo y amino. Existen pocos disolventes para la quitina, pero para el quitosano casi todos los ácidos

acuosos lo disuelven fácilmente, siendo el ácido acético y fórmico los más utilizados (Se-kwon, 2011e: p.13).

La producción de quitina y derivados de los residuos de mariscos es en gran parte dependiente del contenido de quitina en el caparazón utilizado, que varía dependiendo de la especie esto se debe a factores ambientales, alimentación, etapa de maduración, y condiciones de recolección (Se-kwon, 2011f: p.13).

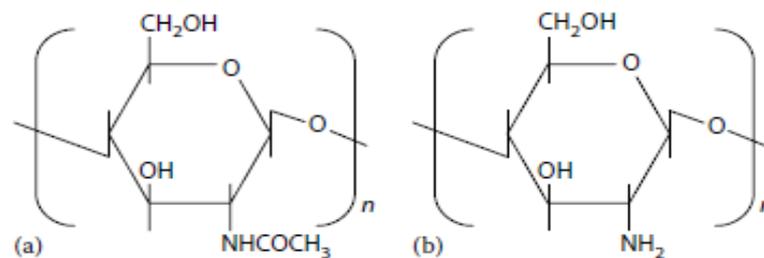


Figura 2-1: Estructuras moleculares de (a) quitina y (b) quitosano.

Fuente: (Se-kwon, 2011g: p.13)

1.5. Producción / procesamiento de quitina y quitosano.

El procesamiento de mariscos produce admirables cantidades de materiales de desecho, y se pueden procesarse en quitina, o su derivado más valioso el quitosano. La producción de quitosano implica un tratamiento con ácido (descalcificación), un tratamiento alcalino (desproteínización); también, un proceso de decoloración y posterior desacetilación típicamente con un álcali fuerte a alta temperatura y presión o a través de procesos enzimáticos (Amber y Bumgardner, 2017a: pp.4-5).

En el proceso de producción del quitosano se encuentran varios factores implicados que producen variabilidad en las propiedades fisicoquímicas del polímero, siendo los más importantes la temperatura, el tiempo de incubación, la concentración alcalina, la proporción de quitina alcalina, la atmósfera, la fuente de quitina, el tamaño de partícula, algunas condiciones de desacetilación, y el uso de procesos de la desacetilación de un solo paso o múltiples pasos (Van Den *et al.*, 2014, pp.1-2).

Los métodos de producción de quitina y quitosano pueden variar, todos involucran infaliblemente la desproteínización y la desmineralización de las conchas de los crustáceos. Factores tales como el tipo de concha (camarón, cangrejo, langosta), la frescura del caparazón, y la porción de caparazón manipulada intervienen en la cantidad de quitina presente en una concha, así como en los rendimientos del quitosano (Amber y Bumgardner, 2017b: pp.4-5).

El procesamiento de quitina / quitosano involucra la trituración y el secado de los residuos. El producto se procesa con ácidos y posteriormente con álcalis para eliminar el mineral de calcio y proteína, respectivamente. El caparazón tratado obtenido después de este proceso es quitina, que se seca y se guarda. La quitina se trata con hidróxido de sodio concentrado (NaOH) en un proceso conocido como desacetilación para producir quitosano. Figura 3-1 (Amber y Bumgardner, 2017c: pp.4-5).

Pocos trabajos publicados informan sobre la producción de quitina y quitosano a partir de hongos e insectos y sobre la composición de la quitina de crustáceos terrestres. En donde se ha determinado que el rendimiento de la quitina y el quitosano de estas fuentes resulta menor que el de las fuentes de crustáceos acuáticos. El problema en el proceso de producción de la quitina formada con otros compuestos como la melanina (en insectos) y el glucano (en hongos) se debe a la difícil extracción y purificación de la quitina y el quitosano a partir de los insectos y hongos (Se-kwon, 2011h: pp.22-26).

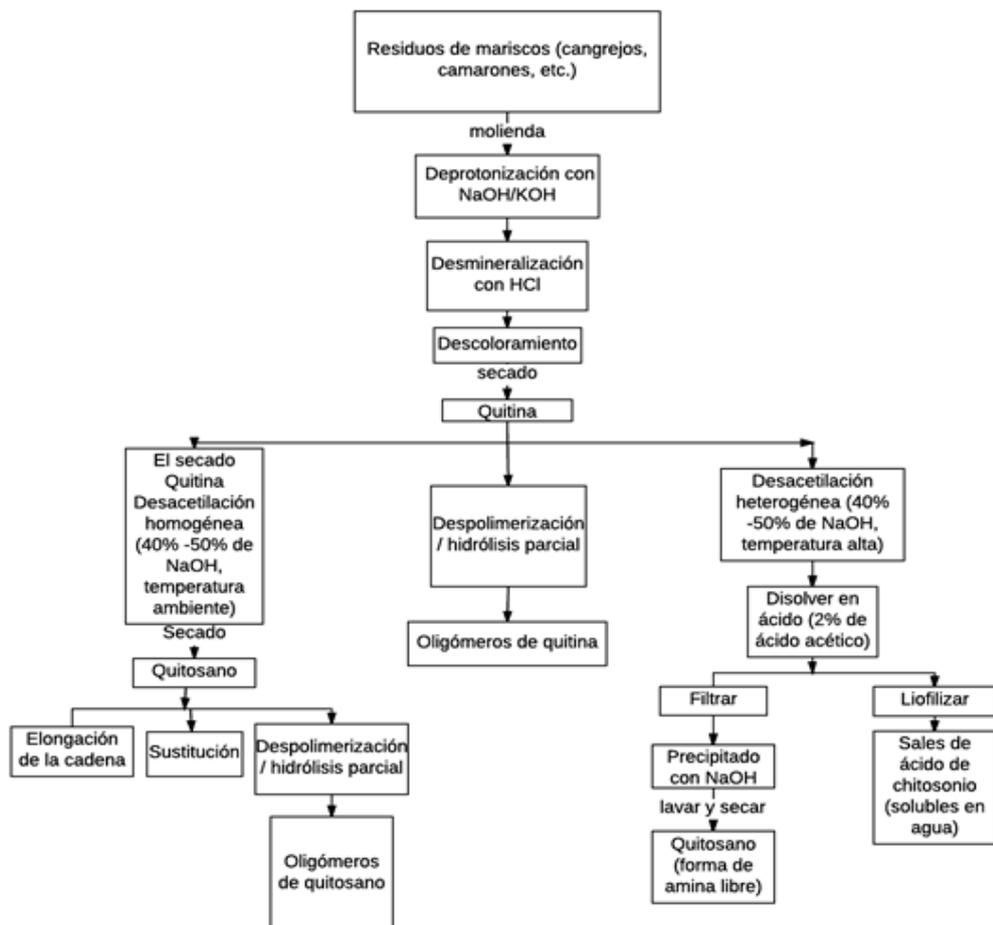


Figura 3-1: Procesos químicos para la obtención de quitina, quitosano y los oligómeros de quitina / quitosano (COS).

Fuente: (Se-kwon, 2011i: pp.14-16)

1.6. Propiedades generales del quitosano.

El quitosano comercial generalmente tiene un grado de desacetilación (DD) que oscila entre el 70 y el 95% y un peso molecular de 104-106 g / mol. De tal manera, que es importante conocer el número de grupos N-desacetilados (DD), en la valoración de la eficacia del proceso de desacetilación de quitina (Moura *et al.*, 2011a: pp.351-352).

Las muestras pueden presentar características distintas con respecto al grado de desacetilación y distribuciones de peso molecular, que a su vez concretan su aplicación e intervienen en el rendimiento del biopolímero. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que el efecto antimicrobiano del quitosano estaría relacionado con el peso molecular como con el DD. De la misma forma, la actividad antibacteriana del quitosano contra las bacterias Gram negativas, aumenta con la disminución del peso molecular y el pH (Moura *et al.*, 2011b: pp.351-352).

El quitosano es una base débil debido a la presencia del residuo de D-glucosamina y es insoluble a valores de pH neutros y alcalinos. A diferencia de otros polisacáridos naturales como por ejemplo, celulosa, pectina, ácido alginico, dextrano, agar, carragenanos y agarosa que son de naturaleza neutra o acídica (Se-kwon, 2011j: pp.117-118).

1.6.1. Propiedades químicas.

Las propiedades químicas del quitosano se deben a:

1. Grupos amino reactivos.
2. Estructura de poliamina lineal.
3. Grupos hidroxilo reactivos disponibles.
4. Capacidad de quelar muchos iones de metales de transición.

1.6.2. Propiedades biológicas.

Las propiedades biológicas del quitosano son las siguientes:

1. Biocompatible.
2. En abundancia es el segundo polímero natural seguro y no tóxico.
3. Se une a células de mamíferos y microbianas.
4. Acelera la formación de osteoblastos responsables de la formación ósea.

5. Efecto regenerativo sobre el tejido de las encías conectivas.
6. Depresor del sistema nervioso central.
7. Hemostático.
8. Fungistático.
9. Antitumoral.
10. Inmunoadyuvante (Se-kwon, 2011).

Tabla 2-1: Principales aplicaciones del quitosano.

Agricultura	<ul style="list-style-type: none"> • Mecanismo defensivo en las plantas • Estimulación del crecimiento de las plantas. • Recubrimiento de semillas, protección contra la helada • Liberación de tiempo de fertilizantes y nutrientes en el suelo.
Tratamiento de agua	<ul style="list-style-type: none"> • Floculante para clarificar el agua (agua potable, piscinas) • Eliminación de iones metálicos • Polímero ecológico (elimine polímeros sintéticos) • Reducir olores
Alimentos	<ul style="list-style-type: none"> • Protectora, fungistática, antibacteriana recubrimiento para alimentos.
Cosméticos y artículos de tocador	<ul style="list-style-type: none"> • Mantener la humedad de la piel • Tratar el acné • Mejore la flexibilidad del cabello. • Reducir la electricidad estática en el cabello. • Tono de piel • Cuidado oral (pasta de dientes)
Biofarmacia	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunológico, antitumoral • Hemostático y anticoagulante • Curativo, bacteriostático

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Fuente: (Marguerite, 2006, p.623)

Hasta mediados de la década de 1980, las principales aplicaciones de quitosano fueron en la deshidratación de lodos, quelación de iones metálicos y procesamiento de alimentos. En la actualidad oligómeros y polímeros de quitina, quitosano y sus derivados son considerablemente usados en una amplia gama de campos como se mencionan en la tabla 2-1 en agricultura, alimentos, cosméticos, medicina, etc. Se debe a las propiedades biológicas, físico-químicas y mecánicas de estos polímeros.

Además, el quitosano por su no toxicidad, biocompatibilidad y efecto antimicrobiano (Bacterias Gram-negativas, Gram-positivas y hongos), se considera como material biomultifuncional (Nesic *et al.*, 2017, pp.368-369).

Según (Hu., *et al.*, 2017) el quitosano se puede utilizar para numerosas aplicaciones médicas tales como la aplicación ocular tópica, la implantación o inyección y vendaje de heridas. Debido a sus cargas positivas a pH fisiológico, el quitosano podría unirse a las superficies cargadas negativamente de la mayoría de las células y tejidos.

También el quitosano es usado para aplicaciones destinados a polvos, películas y micropartículas (Corsello *et al.*, 2017, pp.3-4).

En la última década ha traído considerable atención la incorporación de aceites esenciales (OE) en películas biopoliméricas comestibles o revestimientos, para que sirvan como barreras antimicrobianas y ser aplicadas para la conservación de los alimentos (Tastan *et al.*, 2016, pp.3-4).

Los autores (Jovanović, *et al.*, 2016a: pp.1-3) aseguran que los aceites esenciales en las matrices de polímeros pueden mejorar las propiedades fisicoquímicas, antimicrobianas, mecánicas, y de color de estos últimos. El quitosano se puede utilizar en forma de recubrimientos por lo que tiene varias ventajas sobre los materiales sintéticos, como la biodegradabilidad, la biocompatibilidad y la calidad de ser respetuoso con el medio ambiente.

La actividad antimicrobiana de las películas de quitosano resulta ser mayor con la adición de aceite esencial de tomillo, mostrando actividad antimicrobiana hasta las 24 h de almacenamiento (Jovanović, *et al.*, 2016b: pp.1-3).

Por las razones expuestas el plástico biodegradable ha surgido como una alternativa al sintético para aplicaciones tanto farmacéuticas como alimentarias (Kaya *et al.*, 2016 a: pp.1-2). Estos bioplásticos se aplicarían a nivel industrial, proporcionándole un tiempo de vida útil más prolongado a los alimentos (Aljawish *et al.*, 2016, pp.551-552).

1.7. Definición de bioplásticos.

Se define a los bioplásticos en sus siglas (BPL) a materiales plásticos, que son considerados biodegradables (se degradan por la acción de los microorganismos), que tienen origen en materiales orgánicos (Pilla, 2011a: pp.1-2).

Los bioplásticos basados en recursos renovables describen a la mayoría de familias de materiales poliméricos. Por tal razón, es importante detallarlos claramente. Según los informes de la Comisión Europea, los productos biológicos describen a los productos no alimentarios derivados de la biomasa (árboles, plantas, cultivos, organismos marinos, algas, residuos biológicos de los hogares, animales, y producción de alimentos) (UNE, 2001, p.9).

Los productos con base biológica comprenden desde productos químicos, como productos cosméticos, aditivos alimentarios, farmacéuticos etc., hasta materiales de gran volumen, como materias primas químicas o biopolímeros generales, excluye productos basados en biocombustibles como el papel, madera y biomasa como fuente de energía (Malinconico, 2017, pp.35-36).

Los plásticos biológicos o bioplásticos pueden ser reciclados naturalmente por procesos biológicos, almacenando recursos naturales limitados (combustibles fósiles). Conjuntamente, reduciendo la emisión de gases de efecto invernadero (CO₂ neutro) (Pilla, 2011b: pp.1-3).

1.7.1. Clasificación de los bioplásticos.

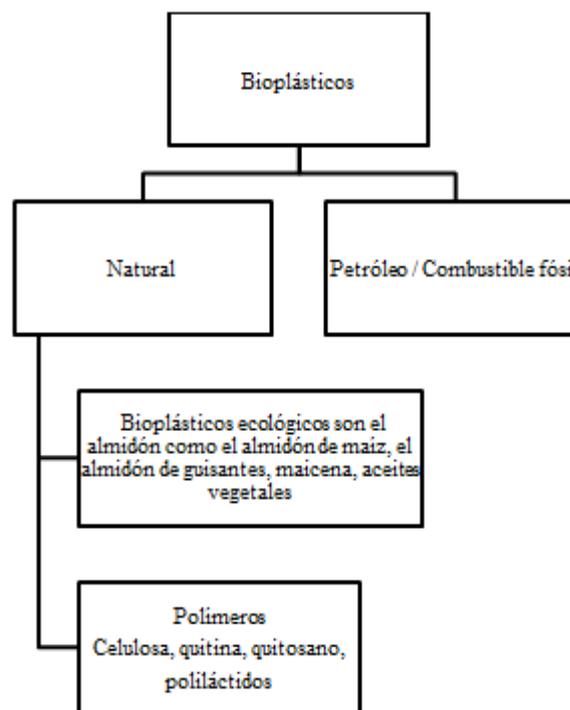


Figura 4-1: Clasificación de los bioplásticos.

Fuente: (Pilla, 2011 c: p.348)

Los polímeros naturales o bioplásticos verdes aún se están investigando la celulosa, almidón, quitina, quitosano (Pilla, 2011d: p.348).

1.8. Materiales para empaques en alimentos.

1.8.1. Bioplásticos procedentes de recursos renovables.

Se pueden clasificar en dos tipos:

- Los provenientes directamente de organismos vivos.
- Los que requieren ser sintetizados pero su procedencia es de un recurso renovable.

1.8.1.1. Polímeros renovables provenientes directamente de organismos vivos.

Incluye a proteínas (colágeno, queratina, gelatina, gluten de maíz o de trigo, proteínas de leche o de soya), polisacáridos (almidón, derivados de celulosa, quitosano, alginatos, carragenatos, y pectinas), lípidos (ceras, ácidos grasos y monoglicéridos) (Cruz et al., 2013a: pp.43-45).

1.8.1.2. Bioplásticos que requieren ser sintetizados (procedencia: recurso renovable)

Bioplásticos que requieren ser sintetizados pero su procedencia es de un recurso renovable. En este grupo se encuentra el ácido poliláctico (PLA), así como algunos poliésteres producto del metabolismo de bacterias (polihidroxialcanoatos o PHA). El PLA es un biopolímero sintetizado a partir de productos agrícolas con un alto contenido en almidón (Cruz et al., 2013b: pp.43-45).

1.8.2. Plásticos derivados del petróleo

El uso de los materiales plásticos derivado del petróleo, como el polietileno (PE) y polipropileno (PO), tienen implicaciones que son altamente negativas en la evaluación de la degradabilidad, capacidad de renovación de los materiales y contaminan el medio ambiente (Gonçalves *et al.*, 2017, pp.1-3).

El mayor porcentaje de registros por ingesta de residuos plásticos en animales, se verifica en la fauna marina como delfines, peces, aves, ballenas entre otros, en los cuales se han encontrado restos de polímeros sintéticos como microplásticos, bolsas etc. Los desechos plásticos causan la contaminación y la muerte de los animales, por la obstrucción del aparato digestivo y otros

problemas fisiológicos. El porcentaje de registro de residuos plásticos en animales terrestres en el contenido estomacal o heces son escasos (Cáceres et al., 2015b: pp.1-3).

Diariamente la población está en contacto con productos químicos artificiales, absorbiendo concentraciones constantes y crónicas del bisfenol A, sustancia química que afecta al sistema endócrino y por lo tanto, pueden interferir procesos controlados hormonalmente de los seres humanos y los animales (Deba y Núñez, 2017 a: pp.53-55).

El bisfenol A se utiliza en la industria del plástico. “Dichos plásticos están presentes en la mayoría de productos comunes, como en dispositivos médicos, botellas de agua y envases de alimentos etc.”. La liberación de este químico al igual que otros químicos utilizados en el plástico, depende de la temperatura y el pH (Deba y Núñez, 2017b: pp.53-55).

1.9. Bioplásticos a base de quitosano.

El segundo polisacárido natural más abundante es la quitina. La quitina como se mencionó anteriormente mediante un proceso de desacetilación química o enzimática se convierte en quitosano. Actualmente, el quitosano se ha convertido en el aditivo de alimentos de origen biológico preferido, esto se debe a sus propiedades antimicrobianas y a su capacidad para formar recubrimientos (Cruz et al., 2013c: pp.43-45).

Los bioplásticos elaborados a partir de quitosano en comparación con otros polisacáridos tiene propiedades ópticas, mecánicas y de barrera al oxígeno superiores, pero no con respecto a la permeabilidad al vapor de agua. Aun así, los bioplásticos de quitosano han sido utilizados en muchos productos, principalmente en aplicaciones sobre frutas y hortalizas (Cruz et al., 2013d: pp.43-45).

1.9.1. Descripción de los compuestos utilizados para elaborar bioplásticos.

Se puede observar en la tabla 3-1 la descripción de los componentes para elaboración de bioplásticos.

Tabla 3-1: Componentes utilizados para la elaboración de bioplásticos.

COMPONENTES	DESCRIPCIÓN
Quitosano	Biopolímero que forman soluciones claras que momento de secado forman bioplásticos fuertes.
Ácido acético	Los usos del ácido acético son numerosos, uno de ellos actúa como

	disolvente en los bioplásticos.
Glicerol	Utilizado como agente plastificante, más comúnmente utilizados en tecnología de los bioplásticos debido a su naturaleza no toxica, con una concentración adecuada de glicerol la elongación de los bioplásticos aumenta y la fuerza necesaria para tensarlas es menor. Es un compuesto que brinda mejores características a las partículas, sin la necesidad de utilizar otros plastificantes.

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Fuente: (Kaya *et al.*, 2016 b: pp.1-2) (Brunson, 2013, pp.58-59)

Para poder envolver un producto con una formulación de un empaque biodegradable implica el uso de al menos un material capaz de formar una matriz con suficiente continuidad y cohesión, Además, es necesario que esta matriz cumpla con propiedades como baja permeabilidad al oxígeno y permeabilidad al vapor de agua (WVP), asimismo pruebas mecánicas como fuerza de tensión (TS), y alargamiento antes de ruptura. (Cruz et al., 2013e: pp.42-45)

La propiedad antioxidante del quitosano se debe a la capacidad de los grupos amino libres residuales de quitosano para reaccionar con los radicales libres formando radicales macromoleculares estables y grupos de amonio. Conjuntamente, la actividad antioxidante del quitosano depende de su concentración, grado de desacetilación, peso molecular y duración de la prueba (Yuan *et al.*, 2016a: pp.6-10).

En estudios realizados se encontró una baja actividad antioxidante de los bioplásticos de quitosano puro comparado con la actividad antioxidante de bioplásticos de quitosano incorporados con aceites esenciales de tomillo y orégano que fue más alta. El aumento de la actividad antioxidante en los bioplásticos se debe a compuestos fenólicos y terpenoides procedentes de los aceites esenciales (OE), que actuarían mediante varios mecanismos como: donantes de hidrógeno, actividad de eliminación de radicales libres, entre otros (Yuan *et al.*, 2016c: pp.6-10).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Lugar de la investigación.

La investigación se realizó en los laboratorios de Productos Naturales y Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

2.2. Recolección de la especie vegetal.

Se recolectaron las partes áreas (tallos, hojas y flores) de *Justicia chlorostachya* Leonard, las cuales fueron obtenidas del Parque Etnobotánico “OMAERE” de la ciudad del Puyo, Provincia de Pastaza.

2.3. Materiales, equipos y reactivos.

2.3.1. Especie vegetal.

Se utilizó tallos, hojas y flores de *Justicia chlorostachya* Leonard.

2.3.2. Materiales.

Tabla 1-2: Materiales de laboratorio utilizados.

Técnica	Materiales
	Vasos de precipitación
	Crisoles de porcelana

Control de Calidad de la especie vegetal	Cápsulas de porcelana
	Pinza para cápsulas
	Vidrio reloj
	Trípode
	Piseta
	Reverbero
	Embudo
	Papel Filtro
Tamizaje Fitoquímico	Gradilla
	Tubos de ensayo
	Pinzas para tubos de ensayos
	Pipetas de 10 mL, 5 mL y 1 mL
	Papel filtro
Obtención del extracto hidroalcohólico	Probeta de 100 mL
	Embudo Buchner
	Embudo simple
	Pipetas de 10 mL, 5 mL y 1 mL
	Vasos de precipitación de 200 mL y 150 mL
	Papel filtro
Control de calidad del extracto hidroalcohólico	Vasos de precipitación de 100 mL y 50 mL
	Cápsula de porcelana
	Pinza para cápsula
	Probeta de 50 mL
	Picnómetro
Cuantificación de compuestos fenólicos y flavonoides totales	Vasos de precipitación de 150 mL, 100 mL y 50 mL
	Pipeta de 5 mL y 10 mL
	Espátula
	Micropipeta de 100 μ L y 1000 μ L
	Piseta
	Matraz de aforo de 100 mL, 25 mL y 10 mL
	Tubos de ensayo
	Puntas amarillas y azules para las micropipetas
	Papel aluminio
Actividad Antioxidante	Tubos de ensayo
	Gradilla
	Papel aluminio
	Micropipeta de 1000 μ L y 100 μ L
	Puntas azules y amarillas para la micropipetas
	Matraz de aforo de 50 mL
	Vaso de precipitación de 150 mL, 100 mL y 50 mL
	Espátula
	Papel aluminio
	Papel de cocina

Elaboración de bioplásticos y Pruebas de control de calidad del bioplástico	Pinza para cápsulas
	Cápsulas de porcelana
	Tasas de aluminio
	Envases plásticos pequeños con tapas
	Recipiente hermético
	Micropipetas de 1000 µL y 100 µL
	Cajas Petri
	Celda de cuarzo

Realizado por: Jessica Monar, 2017

2.3.3. Equipos.

Tabla 2-2: Equipos utilizados en las distintas técnicas.

Técnica	Equipos
Control de Calidad de la especie vegetal	Molino Arthur H. Thomas C.O
	Estufa Memmert SNB 400
	Balanza analítica
	Mufla IVYMEN N-8 LITROS 1100°C
	Desecador
	Sonicador Branson 2510
Obtención del extracto Hidroalcohólico	Bomba de presión al vacío
	Rotavapor BUCHI R 110 & B-465 Water Bath
	Congelador
Control de calidad del extracto hidroalcohólico	Refractómetro
	pH-metro
Cuantificación de fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante.	Vórtex mixer MRC S1-100
	Balanza analítica
	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
	Cronómetro
Elaboración del bioplástico	Balanza analítica
	Estufa Memmert SNB 400
	Agitador magnético
	Termohigrometro
	Sonicador Branson 2510
Espectroscopía Infrarroja	Espectroscopía JASCO FT/IR-4100
Densidad : Peso y espesor del bioplástico	Balanza analítica
	Micrómetro digital
Opacidad	Espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 220
	Micrómetro digital
Humedad	Estufa Memmert SNB 400
	Desecador
Solubilidad en agua (WS)	Balanza analítica
	Estufa Memmert SNB 400

	Agitador magnético
Permeabilidad al vapor de agua (WVP)	Desecador

Realizado por: Jessica Monar, 2017

2.3.4. Reactivos.

Tabla 3-2: Reactivos utilizados en cada técnica.

Técnica	Reactivos
Control de calidad de la especie vegetal	Agua destilada
	Ácido clorhídrico al 10%
Tamizaje Fitoquímico	Etanol
	Éter Etilico
	Agua destilada
	Reactivo Sudan III
	Reactivo de Dragendorff
	Reactivo de Mayer
	Reactivo de Wagner
	Reactivo de FeCl ₃
	Reactivo de Fehling A y B
	Cloruro de Sodio
	Reactivo de Borntrager
	Ácido clorhídrico concentrado
	Ácido clorhídrico al 1%
	Reactivo de Baljet
	Cloroformo
	Anhídrido acético
	Ácido sulfúrico concentrado
	Hidróxido de sodio al 5%
	Cloruro Férrico
	Reactivo para catequinas
Cinta de magnesio metálico	
Carbonato de sodio	
Alcohol amílico	
Obtención del extracto hidroalcohólico	Agua destilada
	Etanol
Control de calidad del extracto hidroalcohólico	Agua destilada
	Etanol
Determinación de fenoles totales del	Reactivo de Folin-Ciocalteu
	Agua destilada

extracto hidroalcohólico	Carbonato de sodio al 7,5%
Cuantificación de flavonoides totales	Metanol
	Agua destilada
	NaNO ₂ al 5%
	AlCl ₃ al 10%
	NaOH
Elaboración de los bioplásticos	Quitosano
	Agua destilada
	Glicerol
	Ácido acético
WS	Agua destilada
WVP	CaCl ₂ anhidro
	KNO ₃
Cuantificación de fenoles totales en el bioplástico	Reactivo de Folin-Ciocalteu
	Carbonato sódico al 10%
	Agua destilada
Cuantificación de flavonoides totales	NaNO ₂ al 5%
	Agua destilada
	AlCl ₃ al 10%
	NaOH
Actividad Antioxidante	Reactivo DPPH
	Metanol
	Agua destilada

Realizado por: Jessica Monar, 2017

2.4. Técnicas y métodos.

2.4.1. *Proceso de limpieza, secado y molienda de la especie vegetal.*

Se eliminó todo tipo de impurezas, con la limpieza minuciosa de la especie vegetal, que posteriormente fue sometida a secado de en una estufa a 40°C. Finalmente, se trituró en un molino apropiado y se almacenó la especie vegetal triturada en bolsas de papel para su estudio.

2.4.2. *Determinación de los parámetros de control de calidad de la especie vegetal.*

Una vez triturada la especie vegetal se procedió a la realización de los parámetros de control de calidad.

2.4.2.1. *Determinación del contenido de humedad.*

El exceso de agua en la droga vegetal promueve el crecimiento de hongos, insectos, etc., y puede inducir hidrólisis de los componentes provocando su pronto deterioro y pérdida.

Procedimiento:

Se pesó 2 g de la especie vegetal molida con una desviación permisible de 0.5 mg, en una cápsula de porcelana previamente tarada, y se colocó en la estufa a 105°C durante 3 horas. Posteriormente, la cápsula se colocó en el desecador en donde se dejó enfriar durante 15 minutos, luego se pesó y nuevamente la cápsula fue llevada a la estufa durante una hora, se dejó enfriar y se pesó hasta obtener una masa constante (Miranda, 2006a: p.34).

Fórmula:

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

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.

2.4.2.2. Determinación de cenizas totales.

Residuo inorgánico que se tiene al incinerar una especie vegetal.

Procedimiento:

Se pesaron 2 g de especie vegetal molida con una desviación de 0.5 mg, y se colocó en un crisol de porcelana previamente tarado. Posteriormente, se carbonizó la muestra en el crisol en un reverbero y una vez que estuvo bien carbonizada la muestra fue colocada en una mufla a una temperatura de 700°C para su incineración, por un lapso de tiempo de 2 horas. Finalmente, se enfrió el crisol en un desecador por 30 minutos y se pesó hasta obtener masa constante (Miranda, 2006b: pp.31- 32).

Fórmula:

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

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)

2.4.2.3. *Determinación de cenizas solubles en agua.*

Esta prueba permite determinar la cantidad de material inorgánico que existe en las cenizas totales.

Procedimiento:

A las cenizas totales que se encuentran en el crisol obtenido anteriormente se añadieron 15 mL de agua, el crisol fue tapado con un vidrio reloj y hervido en la llama del mechero durante 5 minutos. La solución obtenida fue filtrada a través de un papel filtro libre de cenizas, el cual fue colocado en el crisol utilizado inicialmente, se carbonizó en un mechero y se incineró en una mufla a una temperatura de 700°C durante 2 horas. Posteriormente, el crisol fue introducido en el desecador para enfriarlo hasta temperatura ambiente hasta peso constante (Miranda, 2006c: p.33).

Fórmula:

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

Donde:

C_a = 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.

2.4.2.4. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.*

Esta prueba permite determinar el contenido de sustancias minerales insolubles en ácido clorhídrico que contiene la especie vegetal.

Procedimiento:

A las cenizas totales obtenidas anteriormente se le añadieron 3 mL de ácido clorhídrico al 10%, 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 y se une al contenido del crisol; seguidamente, la solución se filtró a través de un papel filtro libre de cenizas, el residuo se lavó con agua caliente repetidamente hasta que la solución filtrada hasta que la solución filtrada acidulada con ácido nítrico (a la cual se añadió 2 gotas de nitrato de plata 0.1 mol/L), no indique la presencia de cloruros.

El filtrado conjuntamente con el residuo fue desecado en estufa a 105°C y luego transferido al crisol utilizado inicialmente, luego se incinera en una mufla a 700°C durante 2 horas. Después de ese tiempo, el crisol se introduce en el desecador y cuando alcanzó la temperatura ambiente se pesó hasta obtener masa constante (Miranda, 2006d: pp. 33-34).

Fórmula:

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

Donde:

B= porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.

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

M = masa del crisol vacío (g)

M₂= masa del crisol con las cenizas ácido clorhídrico (g)

100= factor matemático.

2.4.3. *Tamizaje Fitoquímico.*

Por medio del tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico se pueden determinar cualitativamente los principales grupos fitoquímicos presentes en una especie vegetal, mediante distintas reacciones de coloración o precipitación.

Procedimiento:

Las partes aéreas de la especie vegetal, fueron sometidas a extracciones sucesivas con solventes de diferente polaridad, como se muestra en la figura 1-2.



Figura 1-2: Esquema para elaborar los extractos para el Tamizaje Fitoquímico.

Obtenidos cada uno de los extractos se procedió a realizar las diferentes reacciones de identificación de metabolitos secundarios. Se observa en la figura 2-2, figura 3-2 y en la figura 4-2 los protocolos para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto etéreo, alcohólico y acuoso (Miranda, 2006 f: pp. 40-45).

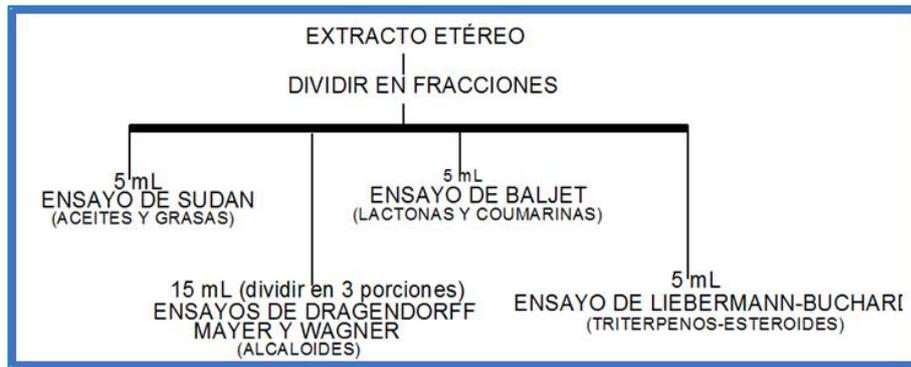


Figura 2-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto etéreo.

Fuente: (Miranda, 2006 , pp. 40-45)

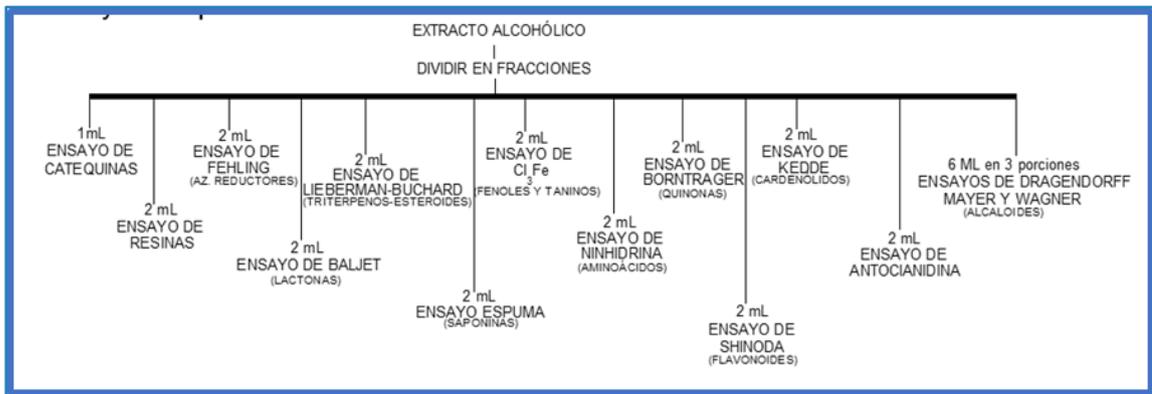


Figura 4-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto alcohólico.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 40-45)

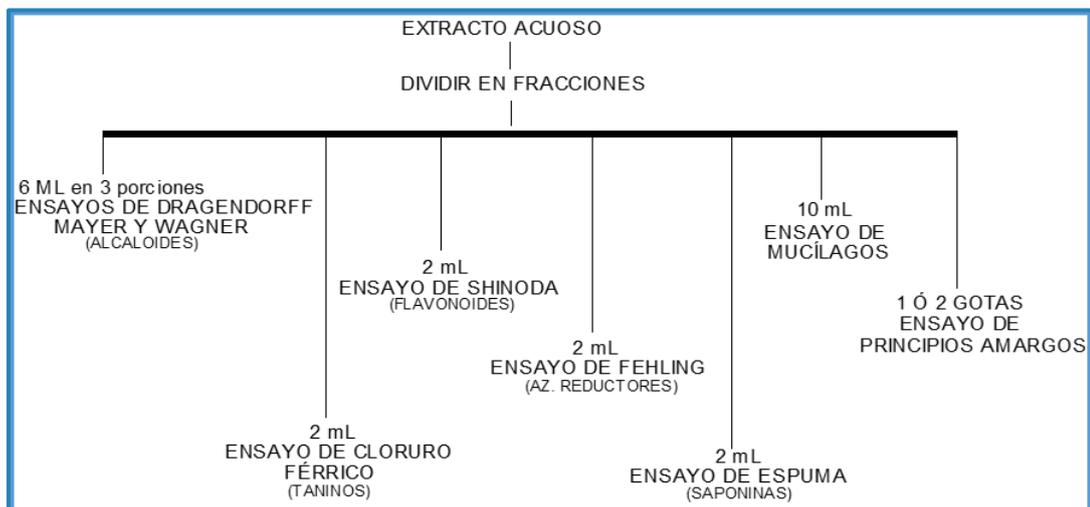


Figura 3-2: Protocolo para realizar el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso.

Fuente: (Miranda, 2006, pp. 41-45)

2.4.3.1. Ensayo de Sudán.

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de compuestos grasos. Para la realización del mismo se tomaron 5 mL del extracto y se le añadió 1 mL de colorante de Sudán III. Se calentó

en un baño de agua hasta volatilización del solvente. Este ensayo se considera positivo si aparecen gotas o una lámina coloreada de rojo en el líquido o en las paredes del tubo de ensayo (Miranda, 2006g: pp.40-45).

2.4.3.2. *Ensayo de Dragendorff.*

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de alcaloides, para lo cual se tomaron 5 mL del extracto, se evaporizó el solvente y el residuo se redisolvió en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua.

En el caso del extracto acuoso, se añadió una gota de ácido clorhídrico concentrado, (se calentó suavemente y dejó enfriar hasta acidez). 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, 2006h: pp. 40-45).

2.4.3.3. *Ensayo de Mayer.*

Este ensayo detecta la presencia de alcaloides, para lo cual se procedió de la misma forma descrita anteriormente hasta obtener la solución ácida. Luego 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, 2006i: pp. 40-45).

2.4.3.4. *Ensayo de Wagner.*

Este ensayo también detecta la presencia de alcaloides, para la realización de este ensayo se procedió de la misma forma que el ensayo descrito anterior hasta obtener la solución ácida; posteriormente, se añadieron 3 gotas del reactivo. El ensayo se considera positivo cuando existe opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++) (Miranda, 2006j: pp. 40-45).

2.4.3.5. *Ensayo de Baljet.*

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, específicamente coumarinas. Si el extracto no está en alcohol, debe evaporarse y redisolverse en 1 mL de alcohol, luego se adiciona 1 mL de reactivo. Se considera este ensayo positivo cuando aparece una coloración roja (++) o un precipitado rojo (+++) (Miranda, 2006k: pp. 40-45).

2.4.3.6. *Ensayo de Borntrager.*

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de quinonas en los extractos. 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, 2006l: pp. 40-45).

2.4.3.7. *Ensayo de Liebermann-Burchard.*

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de compuestos del tipo triterpenos y/o esteroides, ya que ambos poseen un núcleo de androstano, insaturado en el anillo B y la posición 5 y 6.

Para realizar 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; luego, se adicionó 1 mL de anhídrido acético y se mezcló, por las paredes del tubo de 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, 2006m: pp. 40-45).

2.4.3.8. *Ensayo de Catequinas.*

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

2.4.3.9. *Ensayo de resinas.*

Para este ensayo se tomó 2 mL 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).

2.4.3.10. *Ensayo de Fehling.*

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de azúcares reductores. Para realizar este ensayo se evaporó el solvente, en caso de que el extracto no se encuentre en agua, y se redisolvió el residuo en 2 mL de agua. Posteriormente, se adicionó 2 mL de reactivo y la mezcla se calentó en un baño de agua durante 10 minutos. El ensayo es considerado positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo (Miranda, 2006o: pp. 40-45).

2.4.3.11. *Ensayo de la espuma.*

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de saponinas tanto esteroidales como triterpénicas. Para el cual se tomaron 2 mL del extracto y se diluyó con 5 veces su volumen en agua, se mezcló y agitó fuertemente por un lapso de tiempo de 5-10 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 de 2 minutos (Miranda, 2006p: pp. 40-45).

2.4.3.12. *Ensayo de cloruro férrico.*

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de compuestos fenólicos (fenoles y taninos), para lo cual se tomaron 2 mL del extracto alcohólico y se adicionaron 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. En extracto acuoso se determinan taninos, se tomaron 2 mL del extracto y se añadió acetato de sodio sólido y 3 gotas de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica. En caso de que el ensayo sea positivo, los colores desarrollados dan fe del tipo de compuesto fenólico presente, como se indica 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, 2006q: pp. 40-45).

2.4.3.13. *Ensayo de Shinoda.*

Para realizar este ensayo se diluyeron 2 mL del extracto alcohólico o acuoso en 1 mL de ácido clorhídrico y 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 se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo (Miranda, 2006r: pp. 40-45).

2.4.3.14. Ensayo de antocianidinas.

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Primero se calientan 2 mL del extracto alcohólico por un tiempo de 10 minutos con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. Después se dejan enfriar y se adicionan 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico, se agita y espera la separación en dos fases. Si muestra un color rojo a marrón en la fase amílico, es indicativo que el ensayo es positivo (Miranda, 2006s: pp.40-45).

2.4.3.15. Ensayo de mucilagos

Por medio de este ensayo se detecta la presencia de estructuras tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para realizar este ensayo se enfrían 10 mL de extracto acuoso a 0-5°C, si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo (Miranda, 2006t: pp.40-45).

2.4.3.16. Ensayo de principios amargos y astringentes

El ensayo se realiza probando 1 gota del extracto acuoso, reconociendo el sabor de estos principios (Miranda, 2006u: pp.40-45).

2.4.4. Preparación del extracto hidroalcohólico de Justicia chlorostachya L.

Procedimiento:

Se colocaron 100 g de la especie vegetal en 500 mL de etanol al 70% como solvente extractivo y se dejaron en reposo durante 48 horas en un frasco de color ámbar. Luego, el macerado se colocó en un sonicador por 2 horas, se filtró y se procedió a concentrar el extracto en rotavapor a 60°C y se guardó en congelación para su posterior análisis y uso.

2.4.5. Control de calidad del extracto hidroalcohólico.

2.4.5.1. Requisitos organolépticos.

- *Determinación de olor:* Se tomó una tira de papel secante de 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo, se olfateó y se determinó la correspondencia con la característica del extracto.
- *Determinación del color:* Se tomó un tubo de ensayo limpio y seco y se llenó las tres cuartas partes con el extracto, se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas y la separación en capas (Miranda, 2006v:pp.56-60).

2.4.5.2. *Determinación de la densidad relativa.*

Es la relación existente entre la masa de un volumen de la sustancia a ensayar a 25°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.

Procedimiento:

Para determinar la densidad relativa inicialmente se pesó un picnómetro vacío y seco a 25°C, luego se llenó con la porción de ensayo manteniéndolo a 25°C durante 15 minutos y se registró el peso. Después se pesó el picnómetro con el agua destilada a 25°C (Miranda, 2006w:pp.56-60).

Fórmula

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

Donde:

M₁: peso del picnómetro de la muestra (g).

M₂: peso del picnómetro con el agua (g).

M: peso del picnómetro vacío (g).

2.4.5.3. *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 tal modo que la misma incida sobre la apertura de entrada del prisma de medición (Miranda, 2006x:pp.56-60).

2.4.5.4. *Medición del pH.*

Es el índice numérico que se usa para expresar la mayor o menor acidez de una solución en función los iones hidronio.

Procedimiento:

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

2.4.5.5. *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 hasta masa constante.

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. Después, la cápsula se trasladó hacia una estufa a 105°C durante aproximadamente 3 horas, después se colocó la cápsula en un desecador para que se enfríe hasta que alcance temperatura ambiente y se registró el peso de la cápsula hasta que se obtuvo masa constante (Miranda, 2006z:pp.56-60).

Fórmula:

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

Donde:

Pr= 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.

2.4.6. Cuantificación de compuestos fenólicos por el método de Folin-Ciocalteu.

El método de Folin-Ciocalteu es utilizado como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en extractos vegetales. Se fundamenta en que los fenoles reaccionan con el reactivo desarrollando una coloración azul. Este reactivo contiene una mezcla de sulfato de litio, agua destilada y bromo, después de eliminar el bromo en campana de extracción se añade tungstato de sodio y molibdato de sodio, agua destilada, ácido fosfórico y ácido clorhídrico y se deja 10 horas en reflujo. Este reactivo de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso. La concentración de compuestos fenólicos fue medida por espectrofotometría UV, esta técnica se basa en una reacción colorimétrica de óxido-reducción en el que el agente oxidante es el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En primer lugar, se preparó una curva de calibración para lo que se utilizaron soluciones estándar de ácido gálico a las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm (mg/L).

Procedimiento:

El procedimiento fue el mismo tanto para los extractos como para las soluciones estándar.

Se tomaron 250 μ L de la solución de muestra y se añadieron 15 mL de agua destilada. Posteriormente, se añadieron 1,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu. La mezcla se homogenizó en un agitador vórtex por un lapso de tiempo de 2 minutos y se dejó en la oscuridad por 8 minutos. Luego se adicionaron 3,75 mL de carbonato de sodio al 7,5%; se aforó a 25 mL y se homogenizó en agitador vórtex por 2 minutos y se dejó nuevamente en la oscuridad durante 2 horas. Finalmente, se procedió a medir la absorbancia a 765 nm (García, Segovia y Fuentes, 2010). Los resultados se expresaron como miligramos de equivalentes de ácido gálico en mL de extracto.

2.4.7. Cuantificación de flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales fue evaluada por espectrometría UV. En primer lugar, se preparó una curva de calibración de soluciones estándar de quercetina a las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 ppm (mg/L).

Procedimiento:

El procedimiento fue el mismo tanto para los extractos, bioplásticos y soluciones estándar. Se tomó 1 mL de la solución muestra y se colocó en un tubo de ensayo, y se añadieron 4 mL de agua destilada, seguidamente 300 μ L de nitrito de sodio al 5%, se homogenizó por 1 minuto y se dejó en oscuridad 5 minutos. Posteriormente, se adicionaron 300 μ L de tricloruro de aluminio al 10% y se homogenizó por 1 minuto y se dejó en oscuridad 5 horas, después se añadieron 2 mL de hidróxido de sodio 1 M, se homogenizó por 1 minuto y se dejó en oscuridad 15 minutos. Por último, se registraron las absorbancias de las muestras a 510 nm (Boukhris *et al.*, 2012, pp. 1206-1213).

2.5. Preparación de los bioplásticos.

Para la formulación de bioplásticos se siguió la metodología de Wang *et al.*, (2013a: p.36) con ligeras modificaciones.

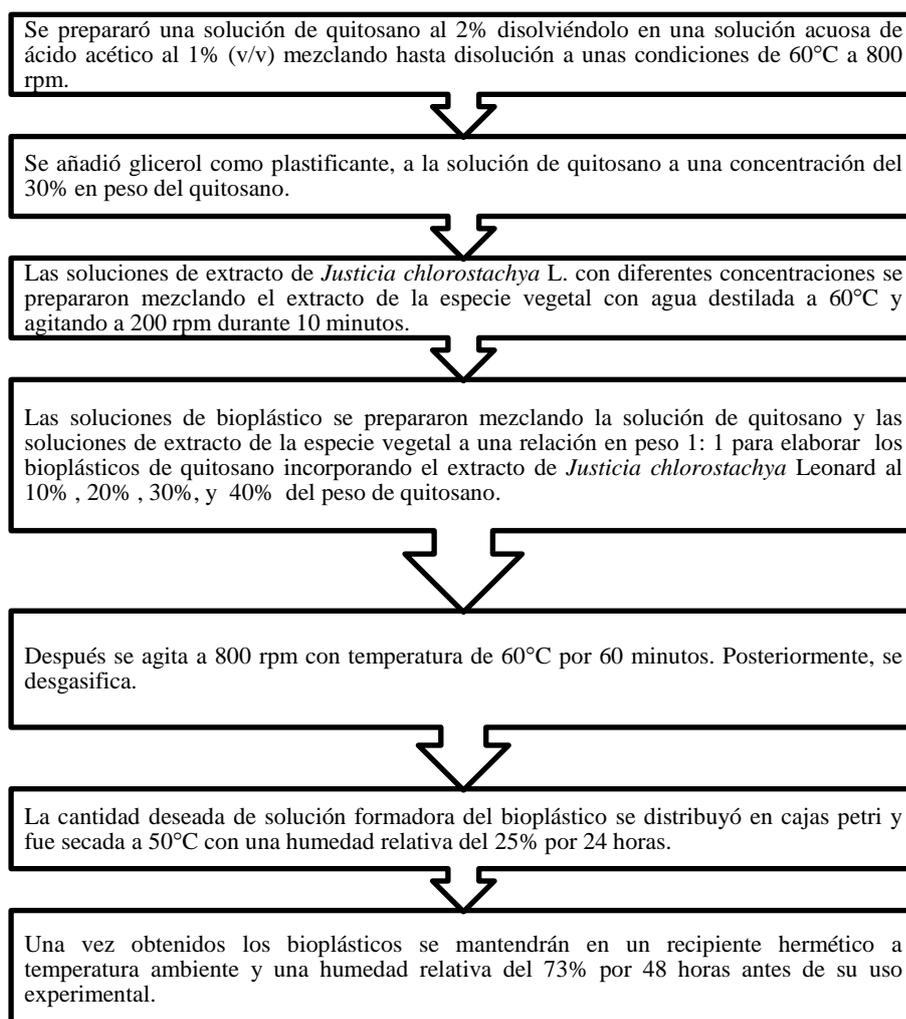


Figura 5-2: Esquema para la elaboración de los bioplásticos

Realizado por: Jessica Monar, 2017

2.5.1. Pruebas para determinar la calidad del bioplástico.

2.5.1.1. Análisis por Espectroscopía Infrarroja

La espectroscopía infrarroja se usa para investigar las interacciones del quitosano y los compuestos fenólicos del extracto en los bioplásticos (Wang *et al.*, 2013b: p.36).

2.5.1.2. Densidad.

La densidad del bioplástico se determinó a partir del peso de la muestra y volumen. El volumen de la muestra se calculó a partir del área de muestra y espesor (Wang *et al.*, 2013c: p.36).

2.5.1.3. Espesor.

El espesor de la muestra se midió utilizando un micrómetro digital con una precisión de $\pm 0,001$ mm en cinco diferentes posiciones en cada muestra (Wang *et al.*, 2013d: p.36).

2.5.1.4. Contenido de humedad.

Se registra la pérdida de peso del bioplástico al someterlo a secado en estufa a 105°C durante 24 h.

Fórmula:

$$H (\%) = \frac{M_w - M_d}{M_w} \times 100$$

Donde:

M_w = es el peso del bioplástico a equilibrio de humedad

M_d = es el peso en seco del bioplástico (Wang *et al.*, 2013e: p.36).

2.5.1.5. Opacidad.

Procedimiento:

- Se midió la absorbancia del bioplástico a 600 nm usando un espectrofotómetro UV-visible.
- Se corta el bioplástico en una pieza rectangular y se coloca directamente en una celda de ensayo del espectrofotómetro, se utiliza una celda de ensayo vacía como referencia (Wang *et al.*, 2013f: p.36).

Fórmula

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

Donde:

O = es la opacidad,

Abs 600 = es el valor de absorbancia a 600 nm

D = es el espesor de la película (mm).

2.5.1.6. Solubilidad en agua.

Procedimiento:

Los bioplásticos se cortaron a 1 cm - 4 cm, luego fueron sumergidos en 50 mL de agua destilada y se agitaron a 100 rpm. Después de 24 horas, las tiras se sacan y se seca a 105°C durante 24 horas y se mide el peso seco final (W_f).

El peso inicial (W_i) se determina previamente secando las tiras en un horno a 105°C hasta peso constante (Wang *et al.*, 2013g: p.36).

Fórmula

$$WS (\%) = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100$$

2.5.1.7. Permeabilidad al vapor de agua.

Se determinó gravimétricamente, para realizar este ensayo se utiliza un recipiente especial de aluminio de 6.0 cm de diámetro, 8.3 cm de diámetro externo y 1.3 cm de profundidad.

Procedimiento:

El recipiente se llena con 2 g de CaCl₂ anhidro para proporcionar HR (humedad relativa) de 0%, luego se coloca en un desecador a temperatura ambiente y 95% HR. El recipiente se pesa periódicamente (cada 2 h durante 18 h) usando una balanza analítica con una precisión de ±0.1 mg.

El WVP del bioplástico se calcula multiplicando la velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) por el espesor.

El WVTR y WVP se determina utilizando las siguientes fórmulas.

$$WVTR = \frac{Pendiente}{A}$$

$$WVP = \frac{WVTR \times d}{p \times (R_1 - R_2)}$$

Donde:

A: área expuesta

d: espesor del bioplástico

p: presión de vapor de saturación del agua a temperatura 25°C.

R₁: HR en el desecador.

R₂: HR dentro de la tasa (Wang *et al.*, 2013 h: p.37).

2.5.1.8. Contenido total de compuestos fenólicos en el bioplástico

Se determina usando el método de Folin-Ciocalteu.

Soluciones acuosas de ácido gálico con concentraciones variadas de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm para obtener la curva de calibración.

Procedimiento:

La solución de extracto del bioplástico se prepara por inmersión 125 mg de muestra de bioplástico en 15 mL de agua destilada durante 24 h.

Se toma de la solución de extracto del bioplástico 0.1 mL. La solución de extracto se mezcló con 6 mL de agua destilada y 0,5 mL de Reactivo de Folin-Ciocalteu. Después de 8 min, se añadieron 1.5 mL de carbonato sódico al 10%.

La mezcla se llevó a 10 mL de volumen total con agua destilada y se incubó durante 2 h en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se midió la absorbancia a 765 nm mediante el uso de un espectrofotómetro UV-visible. El contenido fenólico total se expresó en mg de ácido gálico equivalente (GAE) / g de bioplástico (Wang *et al.*,2013i: p.37).

2.5.1.9. Capacidad de captación de radicales libres mediante DPPH.

Procedimiento:

La solución de ensayo de DPPH se preparó mezclando 9 mL de la solución de extracto de bioplástico con 3 mL de solución metanólica de DPPH (10^{-3} mol L⁻¹). Después de agitar durante 1 minuto, la mezcla se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, se midió la absorbancia de la solución de ensayo a 517 nm. La actividad de captación de DPPH se calculó con la siguiente fórmula.

$$DPPH(\%) = \frac{ADPPH - As}{ADPPH} \times 100$$

Donde:

ADPPH es el valor de absorbancia a 517 nm del metanol solución de DPPH.

As es el valor de absorbancia a 517 nm de la DPPH solución de ensayo (Wang *et al.*, 2013 j: p.37).

Siempre se utilizó las medidas de seguridad como mandil, mascarilla, cofia y guantes durante la realización práctica del proyecto. Además, se realizaron ensayos por triplicado y se obtuvo la media de los datos.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Parámetros de control de calidad del extracto de la especie vegetal

Se observa en la tabla 1-3 los resultados obtenidos de los parámetros de control de calidad de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* Leonard.

Tabla 1-3: Resultados del control de calidad de la especie vegetal.

Parámetro	Resultados (%)
Humedad	10,59 ± 0,07
Cenizas totales	9,41 ± 0,04
Cenizas solubles en agua	4,94 ± 0,04
Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	0,98 ± 0,04

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Entre los parámetros de control de calidad del extracto de las partes aéreas de *Justicia Chlorostachya* L., se determinó el contenido de humedad que fue de 10,59% encontrándose dentro de los rangos establecidos por la USP # 35, que establece un porcentaje $\leq 14\%$, el cual nos indica un adecuado cuidado en la recolección, secado y almacenamiento de la especie vegetal. A menor contenido de humedad se evita posibles procesos de hidrólisis y proliferación de microorganismos.

La determinación de cenizas totales nos permite conocer el contenido inorgánico que presenta la especie vegetal. El porcentaje de cenizas totales obtenidas fue de 9,41%, encontrándose dentro de los valores de referencia establecidos por la USP # 35 que es de $\leq 12\%$.

El porcentaje de cenizas solubles en agua fue de 4,94%, cumpliendo con el rango establecido $\leq 7\%$, este porcentaje representa el contenido de sales solubles; además, se determinó el

porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico que fue de 0,98%, cumpliendo con el rango establecido $\leq 5\%$, el cual permite determinar si la especie vegetal contiene sustancias minerales como la arena.

Se determinó que el extracto analizado de la especie vegetal *Justicia chlorostachya* L. cumple con los parámetros requeridos para su uso.

3.2. Tamizaje fitoquímico

Con el objetivo de conocer cualitativamente los metabolitos secundarios, a continuación, en la tabla 2-3 se puede observar los compuestos identificados en el extracto etéreo, alcohólico y acuoso de la especie vegetal en estudio.

Tabla 2-3: Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L.

Ensayo	Compuesto a identificar	Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
Sudan	Compuestos grasos	+	NA	NA
Dragendorff	Alcaloides	-	+	+
Mayer	Alcaloides	-	+	+
Wagner	Alcaloides	-	+	+
Baljet	Coumarinas	-	-	NA
Liebermann-buchard	Triterpenos y/o esteroides	++	++	NA
Catequinas	Catequinas	NA	+	NA
Resinas	Resinas	NA	-	NA
Fehling	Azúcares reductores	NA	+	+
Espuma	saponinas	NA	+	+
Cloruro férrico	Fenoles y taninos	NA	+++	+++
Borntrager	Quinonas	NA	-	
Shinoda	Flavonoides	NA	+++	+++
Antocianidina	Secuencias de grupos de flavonoides	NA	++	NA
Mucílagos	Polisacáridos	NA	NA	-

Principios amargos	Principios amargos y astringentes	NA	NA	-
--------------------	-----------------------------------	----	----	---

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

(+) Escaso

(++) Moderado

(+++)
Abundante

NA: No aplica

Se observa en la tabla 2-3 los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L. En el extracto etéreo se encontró escasa cantidad de compuestos grasos mediante el ensayo de Sudan. En el extracto alcohólico se evidencian ligeras cantidades de catequinas, azúcares reductores, saponinas y alcaloides mediante los ensayos respectivos; y, en el extracto acuoso se encontró en escasa cantidad saponinas y alcaloides; tanto en el extracto alcohólico como en el acuoso se encontró mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides mediante el ensayo de cloruro férrico y Shinoda, respectivamente.

Por medio del tamizaje los metabolitos secundarios representativos son los compuestos fenólicos y flavonoides, los cuales fueron de importancia para este estudio.

En un estudio realizado por Vélez (2015,p.39) se muestran similares resultados, en donde los metabolitos que mayoritariamente presenta el extracto de *Justicia chlorostachya* L., son los compuestos fenólicos y flavonoides.

3.3. Control de calidad del extracto hidroalcohólico

Los resultados obtenidos del control de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Justicia Chlorostachya* Leonard se observan en la tabla 3-3.

Tabla 3-3: Determinación de los parámetros de calidad del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L.

Características organolépticas	
Parámetro	Resultados
Aspecto	Turbio
Color	Ligeramente rojizo
Olor	Alcohólico, aromático
Sabor	Astringente

Características físico-químicas	
Parámetro	Resultados
Densidad relativa	0,983 g/mL
pH	6,10
Índice de refracción	1,364
Sólidos totales	1,18%

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Como se observa en la tabla anterior, el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L., presentó un color ligeramente rojizo, con olor alcohólico aromático y sabor astringente. El color rojo se debe a la presencia de flavonoides (Harborne, 1980, p.18).

La densidad relativa del extracto de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L. fue 0,983g/mL. El valor obtenido indica la presencia de sustancias disueltas en el extracto.

El índice de refracción fue de 1,364 y el resultado del porcentaje de sólidos totales 1,18%. A mayor valor de sólidos totales, mayor es la probabilidad de existencia de metabolitos activos presentes.

El pH fue ligeramente ácido con un valor de 6,10; este valor se debe a las características ácidas débiles de fenoles, flavonoides, taninos (Ochoa *et al.*, 2013, p.57).

3.4. Cuantificación de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu del extracto.

Se cuantificaron los fenoles del extracto de las partes aéreas de *Justicia Chlorostachya* Leonard usando el método Folin-Ciocalteu, para lo cual se elaboró la curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones, la ecuación fue $y = 0.0026 x + 0.0286$ con un valor de $R^2 = 0.9991$. Se observa en el gráfico 1-J.

La lectura en el espectrofotómetro UV-visible fue a una longitud de onda de 765 nm. Con las absorbancias obtenidas y mediante la ecuación de la curva se calculó la concentración de fenoles totales expresados en mg equivalentes de ácido gálico por mL de extracto de la especie vegetal. Se puede observar el resultado en la tabla 4-3.

Tabla 4-3: Resultado de la cuantificación de los compuestos fenólicos del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L.

Extracto	Fenoles totales expresados como mg de ácido

	gálico/ mL de extracto.
Etanólico 70 %	106,82 ± 0,96

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Se observa en el resultado que el extracto de *Justicia chlorostachya* L., posee un considerable contenido de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico 106,82 ± 0,96 mg GAE / mL de extracto. No hay estudios realizados a estas condiciones del ensayo con respecto a esta especie vegetal.

3.5. Cuantificación de flavonoides del extracto

Los flavonoides totales del extracto de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* Leonard fueron cuantificados utilizando un método colorimétrico de tricloruro de aluminio. Previamente se elaboró una curva de calibración de quercetina, la ecuación obtenida fue $y = 0.0012 x + 0.0256$, con un $R^2=0,999$. Se observa en el gráfico 2-J.

La lectura en el espectrofotómetro UV-visible fue a una longitud de onda de 510 nm. Con las absorbancias obtenidas y mediante la ecuación de la curva se calculó la concentración de flavonoides expresados en mg de equivalentes de quercetina por mL de extracto de la especie vegetal.

En la tabla 5-3 se observa los resultados de la cantidad de flavonoides obtenidos en el extracto.

Tabla 5-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L.

Extracto	Flavonoides totales expresados como mg de quercetina / mL de extracto
Etanólico 70 %	40,25 ± 0,38

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Se observa el resultado obtenido del extracto de las partes aéreas de *Justicia chlorostachya* L., el mismo que presenta un considerable contenido de flavonoides expresados como equivalentes de quercetina 40,25 ± 0,38 mg QE / mL de extracto. No hay estudios realizados a estas condiciones del ensayo con respecto a esta especie vegetal.

3.6. Determinación de la calidad de los bioplásticos

3.6.1. Análisis Infrarrojo

Para obtener los espectros de los bioplásticos se realizó un análisis infrarrojo en el equipo espectroscopía IR, el cual se usó para observar las posibles interacciones entre el quitosano y los componentes del extracto de la especie vegetal.

A continuación, se observa en el gráfico 1-3 los picos de cada uno de los tipos de bioplásticos elaborados a base de quitosano con el extracto de *Justicia chlorostachya* L., a diferentes concentraciones de 0; 10; 20; 30 y 40% respectivamente. Con más claridad la gráfica se puede observar en el anexo K en los gráficos 1K, 2K, 3K, 4K y 5K.

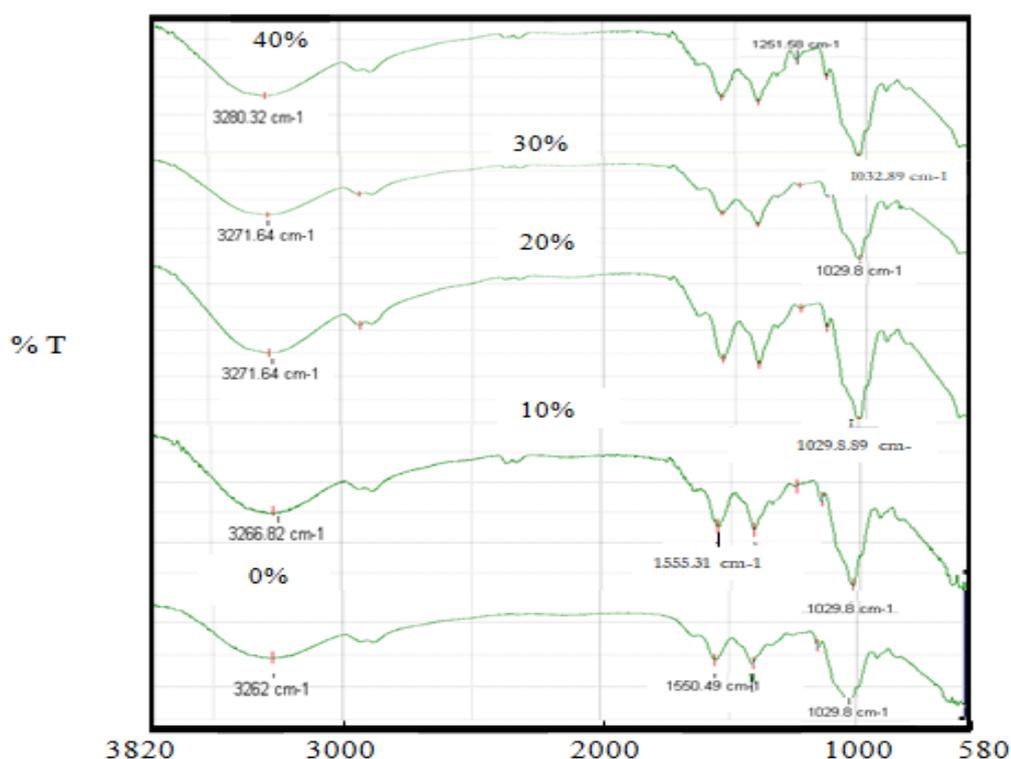


Gráfico 1-3: Espectro IR de los bioplásticos.

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Se puede observar en el gráfico anterior que con el aumento de la concentración del extracto que contiene compuestos fenólicos el pico ubicado a 3262 cm^{-1} se desplazó a $3280,32\text{ cm}^{-1}$ perteneciente al estiramiento O-H. Los picos $2924,52\text{ cm}^{-1}$ y $2877,27\text{ cm}^{-1}$ correspondieron al estiramiento C-H; se observa en el anexo K. El pico $1550,49\text{ cm}^{-1}$ se desplazó a $1548,56\text{ cm}^{-1}$ que corresponden al estiramiento N-H (Shurvell, 2000, pp.1791-1808). Otro cambio fue el nuevo pico que surgió a 1250 cm^{-1} correspondiente a vibraciones de estiramiento C-O; además, se observa

que el pico localizado a 1029 cm^{-1} se desplazó a 1032 cm^{-1} que corresponden a C-O-C por enlaces etéreos, el tramo simétrico de C-O-C se encuentra alrededor de $1020\text{-}1075\text{ cm}^{-1}$ (Banerjee *et al.*, 2002,p.98).

Las observaciones anteriores indicaron que se produjo cambios en la estructura de la cadena del quitosano después de adicionar extracto de *Justicia chlorostachya* Leonard.

En un estudio realizado por Wang *et al.*,(2013) los resultados fueron similares, en donde se elaboró bioplásticos a base de quitosano incorporando polifenoles de té a diferentes concentraciones, se observó un pico de N-H de flexión en quitosano ubicado a 1550 cm^{-1} que se desplazó a 1540 cm^{-1} , y emergió un pico a 1230 cm^{-1} , lo que era atribuible al C-O de los polifenoles. También el pico localizado a 1070 cm^{-1} se hizo más plano y menos discernible, y el pico a 1030 cm^{-1} se desplazó a 1040 cm^{-1} .

Los resultados también fueron similares al estudio realizado por Bourtoom y Chinnan, (2008,p.1635-1639), en el que se prepararon bioplásticos biodegradables basados en quitosano añadiendo una mezcla de almidón de arroz. Presentando el pico a $3233,41\text{ cm}^{-1}$ asociado al estiramiento del O-H. El pico en $2908,04\text{ cm}^{-1}$ correspondiente al estiramiento C-H. En el estudio realizado por (Nunthanid *et al.*, 2001; citado en Bourtoom y Chinnan, 2008) el pico a $3268,23\text{ cm}^{-1}$ corresponde al estiramiento O-H, mientras que el pico a $1541,15\text{ cm}^{-1}$ al N-H.

Cuando se mezclan componentes, las mezclas físicas frente a las interacciones químicas se ven afectadas por los cambios en los picos de los espectros característicos.

3.6.2. Caracterización de opacidad, densidad y contenido de humedad.

Se realizó las pruebas de opacidad, densidad y contenido de humedad a cada uno de los bioplásticos, el blanco como prueba control en la que no se añadió extracto y diferentes concentraciones de extracto al 10, 20, 30 y 40% respectivamente.

Tabla 6-3: Resultados obtenidos de opacidad, densidad y contenido de humedad de los bioplásticos

Bioplástico	Densidad (g/cm^3)	Opacidad (A/ mm)	Contenido de humedad (%)
Blanco	$1,08 \pm 0,05$	$0,87 \pm 0,02$	$43,51 \pm 0,99$
10%	$1,14 \pm 0,03$	$1,58 \pm 0,09$	$35,43 \pm 0,79$
20%	$1,19 \pm 0,08$	$2,01 \pm 0,15$	$32,25 \pm 0,59$

30%	1,24 ±0,08	2,30 ± 0,08	29,63 ± 0,47
40%	1,26 ±0,09	2,55 ± 0,09	27,16 ± 0,70

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Se observa en la tabla 6-3 los resultados obtenidos sobre densidad, opacidad y contenido de humedad de los bioplásticos.

Los resultados fueron analizados estadísticamente mediante el programa SPSS 21, por medio del análisis de varianza univariante se realizó las pruebas de los efectos inter-sujetos para verificar si existen diferencias significativas, se aprecia en el gráfico 1 N los efectos de la concentración de compuestos fenólicos sobre la densidad, opacidad y contenido de humedad en los bioplásticos.

A pesar de que el efecto de la incorporación de compuestos fenólicos en la densidad no se verifican afectaciones significativas ($p > 0,05$), la densidad de los bioplásticos aumentó levemente con el aumento de la concentración de extracto de *Justicia chlorostachya* Leonard. En cambio, la opacidad y el contenido de humedad de los bioplásticos se vieron significativamente afectados ($p < 0,05$) debido al aumento de la concentración de extracto de *Justicia chlorostachya* Leonard.

Los bioplásticos de control fueron más transparentes que los bioplásticos a los que se añadió extracto de la especie vegetal; por lo tanto, el valor de la opacidad de cada uno de los bioplásticos aumentó con la concentración de extracto, esto se esperaba y es atribuible al contenido de compuestos fenólicos que contiene el extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya* Leonard.

Las interacciones entre el quitosano y los compuestos fenólicos son responsables de que el contenido de humedad disminuya con el aumento de la concentración de extracto, porque las interacciones podrían reducir la disponibilidad de grupos hidroxilo y amino, a su vez, limitan las interacciones del agua con el quitosano a través del enlace de hidrógeno (Wang *et al.*, 2013k: p.38).

Resultados similares se obtuvieron al elaborar bioplásticos de quitosano incorporando polifenoles de té realizado por Wang *et al.*, (2013l:p.38), los bioplásticos fueron menos transparentes y presentaron mayor opacidad a mayor concentración de extracto.

La apariencia de los bioplásticos es una propiedad importante, debido a que al utilizarlos como revestimiento superficial de alimentos o para mejorar la apariencia del producto (Jridi *et al.*,

2014,p.14), pueden afectar el aspecto general y la aceptación del consumidor (Peng y Li, 2014,p.291) por lo tanto, se desea que los compuestos activos incorporados no cambien su transparencia.

3.6.3. Solubilidad en agua

En la tabla 7-3 se observan los resultados obtenidos de la solubilidad en agua de los bioplásticos obtenidos a las diferentes concentraciones de extracto vegetal.

Tabla 7-3: Resultados de la solubilidad en agua de los bioplásticos a diferentes concentraciones de extracto de *Justicia chlorostachya* L.

Concentración	Porcentaje (%)
BLANCO	20,59 ± 1,06
10%	19,66 ± 0,31
20%	18,59 ± 0,53
30%	17,38 ± 0,26
40%	16,62 ± 0,60

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

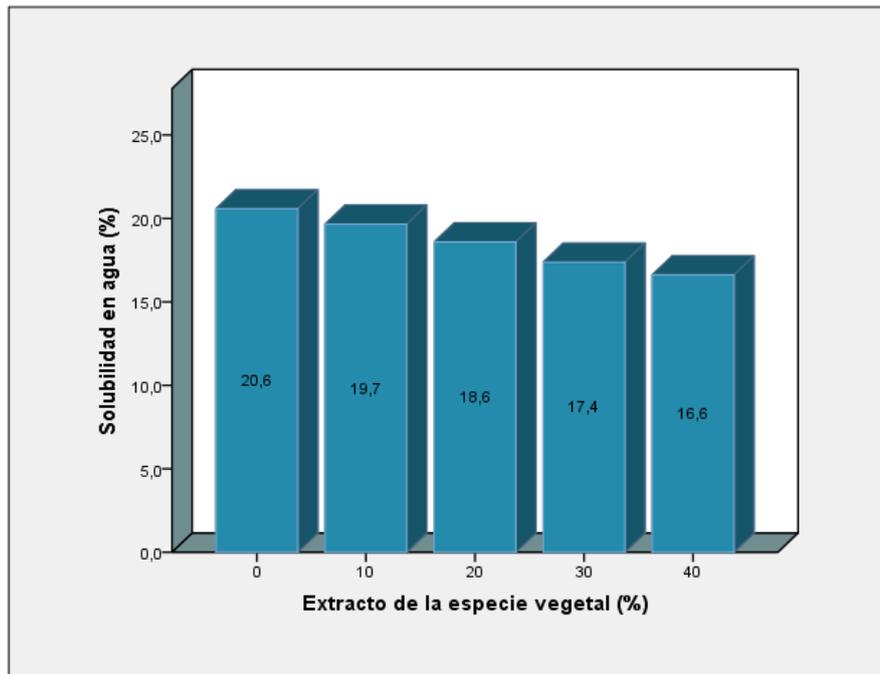


Gráfico 2-3: Solubilidad en agua de los bioplásticos

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Después de aplicar el test ANOVA de un factor, se determinó que existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos donde ($p < 0.05$), consecuentemente se rechaza la hipótesis nula (H_0); se puede observar en la gráfica 3-N.

Los resultados mostrados en el gráfico 2-3 exhiben que el bioplástico de quitosano sin la adición de extracto de *Justicia chlorostachya* Leonard presentó una solubilidad en agua del 20,59%, valor que es cercano al valor de 23,52% informado por Wang et al.,(2013) y el valor de otro estudio que obtuvo el valor de 23,2% informado por Ojagh *et al.*, (2010).

En este estudio la solubilidad en agua porcentual fue disminuyendo a mayor concentración de extracto añadido a los bioplásticos, contrario al estudio realizado por Wang et al.,(2013m: p.38), en donde sus resultados presentaron un aumento del porcentaje de la solubilidad en agua a mayor concentración de extracto.

La solubilidad en agua es una propiedad importante de los bioplásticos para aplicaciones en la protección de alimentos.

3.6.4. Permeabilidad al vapor de agua

A continuación, se observan en la tabla 8-3 los valores obtenidos con respecto a la permeabilidad al vapor de agua de cada uno de los bioplásticos a concentraciones de extracto de 0, 10, 20, 30 y 40% respectivamente.

Tabla 8-3: Resultados de la permeabilidad al vapor de agua de los bioplásticos a diferentes concentraciones de extracto de *Justicia chlorostachya* L.

Concentración	g mm/m²día kPa
Blanco	6,23
10%	3,55
20%	3,24
30%	3,15
40%	3,02

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

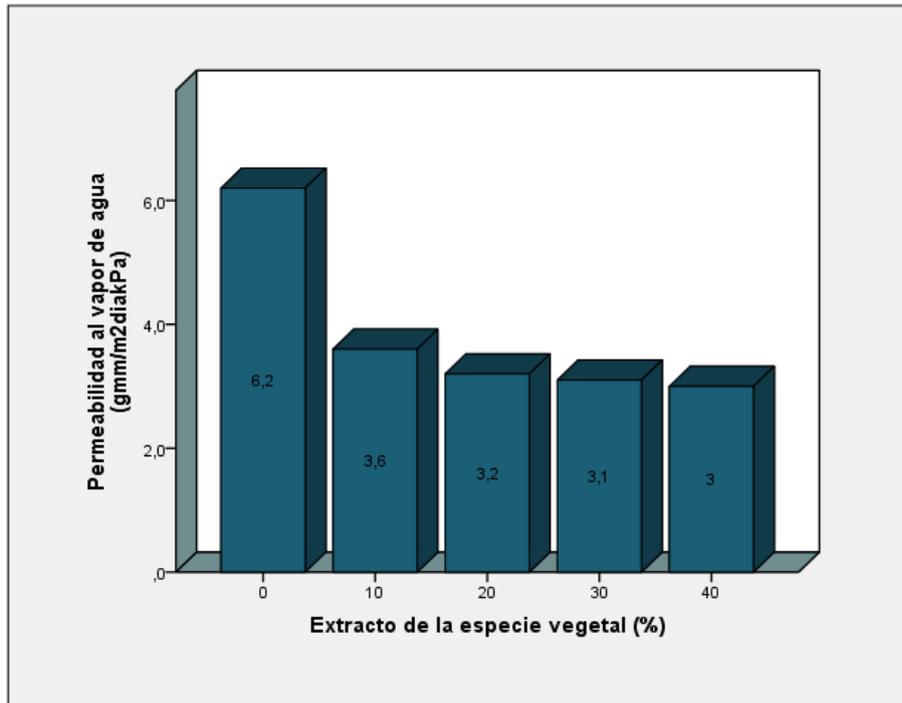


Gráfico 3-3: Permeabilidad al vapor de agua de los bioplásticos

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

Después de aplicar el test ANOVA de un factor a los resultados, se logró determinar que existe una diferencia significativa entre los resultados obtenidos donde ($p < 0.05$), consecuentemente se rechaza la hipótesis nula (H_0); se puede observar en el gráfico 4-N.

Una de las funciones principales de un bioplástico es impedir la transferencia de humedad entre los alimentos y la atmósfera circundante, por lo que WVP del bioplástico debe ser lo más baja posible (Bourtoom y Chinnan, 2008b: p.1632). En general, la transferencia de vapor de agua depende tanto de la difusividad como de la solubilidad.

Se puede observar en el gráfico 3-3 que a medida que aumenta la concentración del extracto de la especie vegetal, la WVP de los bioplásticos disminuye.

La WVP del bioplástico a mayor concentración de extracto de *Justicia chlorostachya* L. es 3,02 g mm/m² día kPa; en comparación con el estudio realizado por Wang *et al.*, (2013n:pp.38-39) en la formulación del 40% de polifenoles, que alcanzó 5,77 g mm/m² día kPa.

Por lo tanto, el bioplástico de este estudio tiene mejor capacidad para evitar la transmisión de la humedad.

3.6.5. Contenido fenólico total de los bioplásticos

Se cuantificaron los fenoles totales del extracto en el bioplástico en función del tiempo usando el método de Folin-Ciocalteu.

La lectura en el espectrofotómetro UV-visible fue realizada a una longitud de onda de 765 nm, y mediante la ecuación de la curva que se observa en el gráfico 1-J, se calculó la concentración de fenoles totales expresados en mg de equivalentes de ácido gálico por g de bioplástico. Se pueden observar los resultados en la tabla 9-3.

Tabla 9-3: Resultados de la cuantificación de compuestos fenólicos de los bioplásticos.

Concentración	Día 1	Día 6	Día 12	Día 18	Día 24
Blanco	7,98 ± 2,31	7,98 ± 2,31	4,92 ± 2,31	4,92 ± 2,31	4,92 ± 2,31
10%	57,23 ± 4,62	49,54 ± 2,31	44,92 ± 2,31	37,23 ± 2,31	31,08 ± 2,31
20%	97,23 ± 2,31	91,08 ± 2,31	86,46 ± 2,31	81,85 ± 2,31	75,69 ± 4,62
30%	197,23 ± 2,31	181,85 ± 4,62	171,07 ± 2,31	157,23 ± 2,31	149,54 ± 4,62
40%	274,15 ± 4,62	240,31 ± 2,31	229,54 ± 2,31	208,00 ± 2,31	194,15 ± 2,31

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

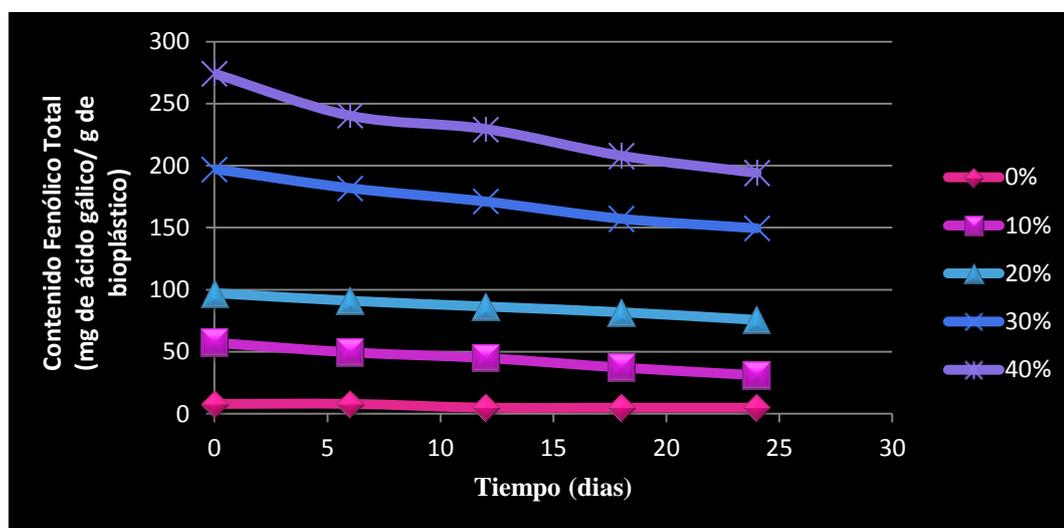


Gráfico 4-3: Contenido fenólico total del bioplástico en función del tiempo.

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

En el gráfico 4-3 se observa la disminución del contenido fenólico total de los bioplásticos preparados a diferentes concentraciones de extracto en el tiempo. Después de incorporar el extracto de *Justicia chlorostachya* Leonard, el contenido fenólico total de los bioplásticos fue mayor que el bioplástico control y aumentó significativamente ($p < 0,05$) a mayor concentración de extracto.

El bioplástico que contiene un 40% de extracto presentó el más alto contenido fenólico total expresado como equivalentes de ácido gálico ($274,15 \pm 4,62$ mg GAE / g de bioplástico). El contenido fenólico de los bioplásticos preparados a las concentraciones de extracto de 10, 20 y 30% fue menor con respecto al de 40%; sin embargo, el contenido fenólico disminuyó significativamente con el tiempo en todos los casos; situación que puede atribuirse a la oxidación de compuestos fenólicos.

3.6.6. Cuantificación de flavonoides en los bioplásticos.

Los flavonoides totales del extracto del bioplástico fueron cuantificados utilizando un método colorimétrico de tricloruro de aluminio.

La lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 510 nm. Con las absorbancias obtenidas y mediante la ecuación de la curva que se observa en el gráfico 2-J, se calculó la concentración de flavonoides expresados en mg de equivalentes de quercetina por g de bioplástico. Se pueden observar los resultados en la tabla 10-3.

Tabla 10-3: Resultados de la cuantificación de flavonoides de los bioplásticos.

Concentración	Día 1	Día 6	Día 12	Día 18	Día 24
Blanco	$4,86 \pm 0,76$	$4,86 \pm 0,76$	$4,35 \pm 0,76$	$4,35 \pm 0,76$	$4,35 \pm 0,76$
10%	$15,77 \pm 3,04$	$14,99 \pm 3,42$	$10,69 \pm 1,14$	$10,18 \pm 0,76$	$9,17 \pm 1,14$
20%	$29,94 \pm 4,56$	$26,14 \pm 1,90$	$21,83 \pm 1,52$	$20,57 \pm 1,50$	$15,75 \pm 1,52$
30%	$36,53 \pm 1,14$	$33,74 \pm 1,52$	$32,47 \pm 1,90$	$31,46 \pm 1,52$	$30,95 \pm 1,14$
40%	$46,16 \pm 1,76$	$43,37 \pm 3,55$	$43,11 \pm 2,28$	$41,85 \pm 1,84$	$40,33 \pm 1,90$

Realizado por: Jessica Monar, 2017

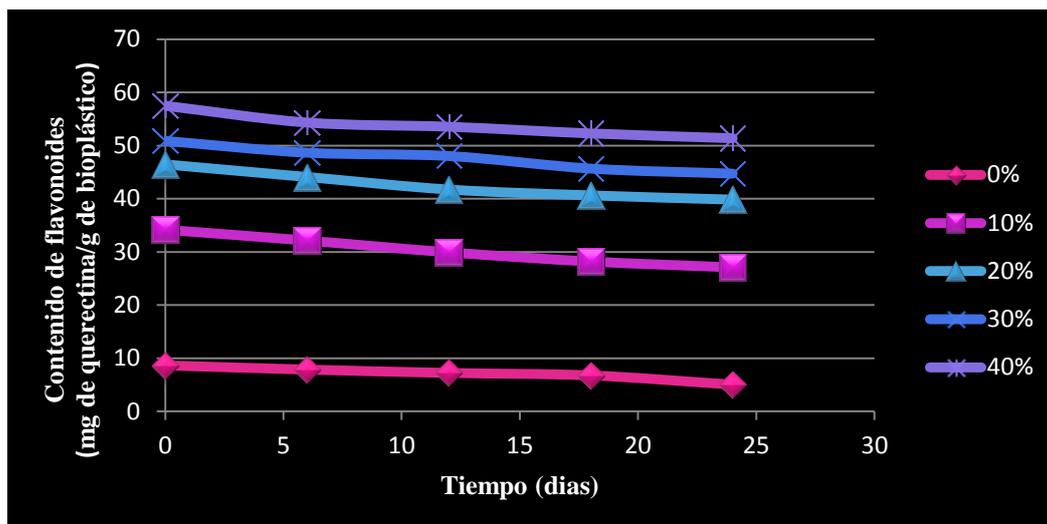


Gráfico 5-3: Contenido de flavonoides del extracto del bioplástico en función del tiempo.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

Después de realizarse el test ANOVA de un factor, se determinó que existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos donde ($p < 0.05$), consecuentemente se rechaza la hipótesis nula (H_0); que se puede observar en el gráfico 6 N.

Se observa en el gráfico 5-3 que el bioplástico que contiene un 40% de concentración de extracto de *Justicia chlorostachya* L., fue el que presentó el más alto valor de compuestos tipo flavonoide, que fue de $46,16 \pm 1,76$ mg QE /g de bioplástico.

En algunas especies vegetales dentro del grupo de los compuestos fenólicos los que más prevalecen en cantidad son los flavonoides, estos compuestos actúan primariamente como antioxidantes (Siedentopp, 2009, pp. 197-198).

3.6.7. Determinación de la actividad antioxidante de los bioplásticos

La actividad antioxidante de los bioplásticos se evaluó mediante el método de captación de radicales libres (DPPH), radical que se disuelve en metanol y su color púrpura muestra una absorción característica a 517 nm; las moléculas antioxidantes eliminan el radical libre mediante la donación de hidrógeno y el color de la solución de DPPH se torna amarillo claro, lo que da como resultado una disminución de la absorbancia. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 11-3

Tabla 11-3: Resultados del porcentaje de actividad antioxidante del bioplástico mediante el análisis de la captación de radicales libres.

Concentración	Día 1	Día 6	Día 12	Día 18	Día 24
Blanco	8,66	7,87	7,24	6,77	5,04
10%	34,17	32,13	29,92	28,19	27,09
20%	46,46	44,09	41,73	40,63	39,84
30%	50,87	48,66	48,03	45,67	44,72
40%	57,48	54,33	53,54	52,28	51,38

Realizado por: Jessica Monar, 2017

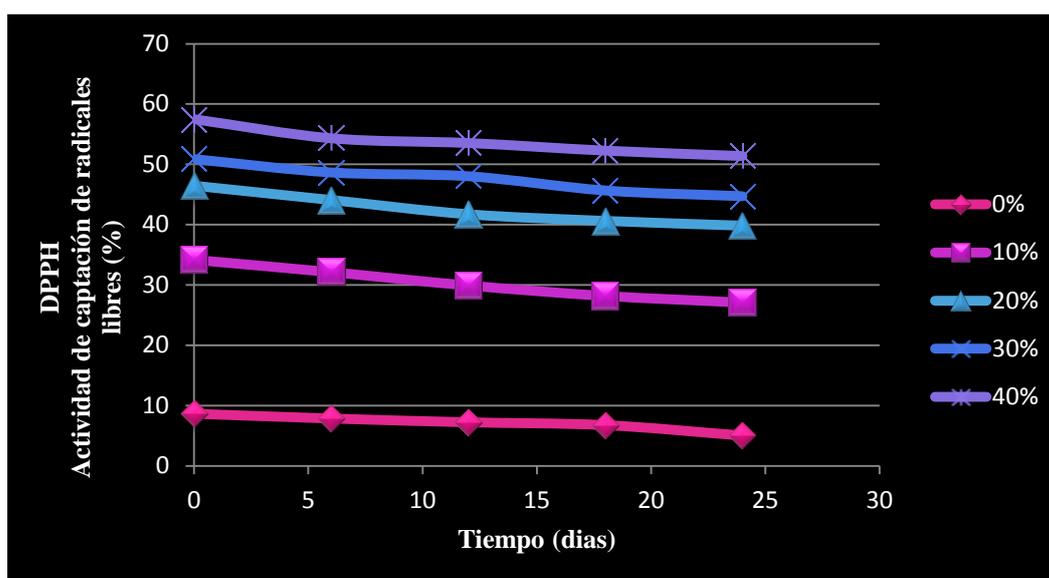


Gráfico 6-3: Porcentaje de la actividad de captación de radicales libres en función del tiempo.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

El potencial antioxidante por lo general se revela al expresar la actividad antioxidante en términos de contenido fenólico total. Las propiedades antioxidantes ayudan principalmente a las actividades de eliminación de radicales, su importancia radica en lo perjudicial que resultan ser los radicales libres en los alimentos y en el sistema biológico (Pan *et al.*, 2008,p.1269).

Se observa en el gráfico 6-3 que la incorporación de compuestos fenólicos aumentó significativamente ($p < 0,05$) el porcentaje de captación de DPPH en los bioplásticos, la formulación del 40% de concentración de extracto fue la que obtuvo el mayor valor de captación del radical libre 57,48%, la actividad antioxidante aumentó seis veces respecto al bioplástico control y declinó al día 24 hasta un 51,38%.

En estudios realizados tanto por Kannat., et al (2008), como Wang *et al.*, (2013) sus resultados revelan que un bioplástico sin adición de extracto muestra una pequeña actividad de captación de radicales libres DPPH, situación similar que se aprecia en los resultados de este estudio.

La actividad de captación de radicales libres de los bioplásticos basados en quitosano incorporados con el extracto total de *Justicia chlorostachya* L., fue mayor que la encontrada en los bioplásticos basados en quitosano incorporados con el aceite esencial de *Zataria multiflora* Boiss y extracto de semilla de uva (Moradi *et al.*, 2012, pp.481-482), demostrando que la especie vegetal *Justicia chlorostachya* Leonard posee una cantidad considerable de compuestos fenólicos que pueden usarse para mejorar la actividad antioxidante de los bioplásticos de quitosano.

CONCLUSIONES

- Se elaboraron bioplásticos basados en quitosano con actividad antioxidante, enriquecidos con extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya* Leonard a diferentes concentraciones (0, 10%, 20%, 30%, y 40%), denotando que el bioplástico con mejores propiedades fue el formulado con 40% de concentración de extracto.

- Se detectaron interacciones entre el quitosano y los compuestos fenólicos verificadas por cambios en los picos del espectro infrarrojo.
- Se determinaron los parámetros fisicoquímicos del bioplástico formulado con 40% de concentración de extracto, con las siguientes propiedades contenido de humedad 27,16%, densidad 1,26 g/cm³, opacidad 2,55 mm, solubilidad en agua WS = 16,62% y permeabilidad al vapor de agua WVP = 3,02 g mm/m² día kPa.
- Se determinó mediante métodos colorimétricos que el bioplástico con una concentración de extracto del 40% presentó una cantidad considerable de fenoles totales expresados como equivalentes de ácido gálico 274,15 mg GAE / g bioplástico y de flavonoides expresados como equivalentes de quercetina 46,16 mg QE /g de bioplástico.
- Se evaluó la actividad antioxidante mediante el método de captación de radicales libres (DPPH), en donde se demostró que la actividad captadora de radicales libres más alta provino del bioplástico formulado con 40% de extracto de *Justicia chlorostachya* Leonard, el cual presentó un porcentaje de 57,48% resultado que es aproximadamente seis veces mayor que la prueba control.
- La incorporación del extracto hidroalcohólico total de *Justicia chlorostachya* Leonard en la solución formadora del bioplástico tiene una influencia positiva considerable en las propiedades fisicoquímicas, lo que hace que muestren un gran potencial para considerarlos como una alternativa viable para usarlos como materiales de empaque.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar otros estudios como el análisis de inhibición contra algunos microorganismos.
- Es necesario realizar pruebas de color y pruebas mecánicas como fuerza de tensión (TS), y alargamiento antes de ruptura.

- Es aconsejable, ampliar el presente trabajo utilizando el bioplástico basado en quitosano incorporado con el extracto hidroalcohólico de *Justicia chlorostachya* L., directamente en alimentos y pruebas de estabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

AIDER, M. “Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry”: Review. A: *LWT - Food Science and Technology* [en línea], 2010, (Canadá) 43(6), pp.837-842. [Consulta: 20 Agosto 2017]. ISSN 00236438. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381000040X>

ALJAWISH, A., et al. “Characterization of films based on enzymatically modified chitosan derivatives with phenol compounds”. *Food Hydrocolloids*. A: *Food Hydrocolloids* [en línea], 2016, (Francia) 60, pp.551-558. [Consulta: 20 Agosto 2017]. ISSN 0268005X .Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16301680>

AMBER, J; & BUMGARDNER, J. *Chitosan Based Biomaterials*.2017. Boston USA: Matthew Deans, pp.1-129

ARANAZ, I., et al. “Chitosan based films as supports for dual antimicrobial release”. A: *Carbohydrate Polymers* [en línea], 2016, (España)146, pp.402-410. [Consulta: 1 Octubre 2017]. ISSN 01448617. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716303009>

ÁVALOS, A., et al. “Metabolismo secundario de plantas”. A: *Reduca (Biología)* [en línea], 2009,(España) 2(3), pp.119-145. [Consulta: 24 Septiembre 2017]. ISSN: 1989-3620.Disponible en: http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

BANERJEE, T., et al. “Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles”. A: *International Journal of Pharmaceutics* [en línea]. 2002, 243(1-2), pp.93-105. [Consulta: 30 Agosto 2017]. ISSN 03785173. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517302002673>

BOUKHRIS, M. et al. “Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of rose-scented geranium, pelargonium graveolens”. A: *Phytotherapy Research* [en línea]. 2012, 27(8), pp.1206-1213. ISSN 0951418X. [Consulta: 2 Septiembre 2017]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027699>

BOURTOOM, T; & CHINNAN, M. “Preparation and properties of rice starch-chitosan blend

biodegradable film”. A: *LWT - Food Science and Technology* [en línea]. 2008, 41(9), pp.1633-1641. [Consulta: 15 Septiembre 2017]. ISSN 00236438. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364380700357X>.

BRUNSON, M. “Ácido Acético, La esencia del Vinagre”. A: *Revista Médica de Homeopatía*. 2013, (Bélgica) 6(2), pp.58-69. [Consulta: 15 Noviembre 2017]. ISSN 18888526. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1888852613000209>

CÁCERES C., et al. “Registros de plásticos en la ingesta de *Tremarctos ornatus* (Carnívora: Ursidae) y de *Nasuella olivacea* (Carnívora: Procyonidae) en el Parque Nacional Natural Tamá, Colombia”. A: *Revista Mexicana de Biodiversidad* [en línea]. 2015,(Colombia) 86 (3), pp.839-842.[Consulta: 26 Julio 2017]. ISSN 18703453. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1870345315000809>.

CORSELLO, F., et al. “Morphology and properties of neutralized chitosan-cellulose nanocrystals biocomposite films”. A: *Carbohydrate Polymers* [en línea], 2017, (Argentina) 156, pp.452-459. [Consulta: 6 Septiembre 2017]. ISSN 01448617. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861716310852?via%3Dihub>

CREUS, E. “ Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud”. [en línea]. 2004, 23(6), pp.80-84. [Consulta: 22 Julio 2017]. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>

CRUZ,R., MARTINEZ, Y; &VIGIL A. “Biopolímeros y su integración con polímeros convencionales como alternativa de empaque de alimentos”.[en línea]. 2013,(México)7(2) pp.42-52. [Consulta: 27 Agosto 2017]. Disponible en: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Cruz-Morfin-et-al-2013.pdf>.

CURCIO, M., et al. “Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure”. A: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línea]. 2009,(Italia) 57(13), pp.5933-5938. [Consulta: 4 Agosto 2017]. ISSN 00218561.Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf900778u>

DEBA, S; & NÚÑEZ, P. “Efectos del bisfenol A en la reproducción femenina”. A: *Medicina Reproductiva y Embriología Clínica*. 2017, (España) 4 (1), pp.52-58. [Consulta: 28 Septiembre 2017] . ISSN 23409320. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2340932017300099>

FERNÁNDEZ A., et al. “Trends in Food Science & Technology The role of wine and food polyphenols in oral health”. 2017, 69, pp.118-130. [Consulta: 19 Octubre 2017] Disponible en : <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224417304521>

GARCÍA, E., SEGOVIA, F. & FUENTES, A. *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Valencia: ETSIAMN,2010.

GARCÍA, R., et al. “Disruptores endocrinos y obesidad: Obesógenos”. A: *Endocrinología y Nutrición* [en línea]. 2012, 59(4), pp.261-267. [Consulta: 9 Octubre 2017] . ISSN 15750922.Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1575092212000022>.

GONÇALVES, F., et al. “The environmental dimension of experimentation in Chemistry Teaching: Use considerations from the holistic metric «green star»”. A: *Educación Química*. 2017, 28(2), pp.99-106. [Consulta: 18 Octubre 2017]. ISSN 0187893X. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0187893X16300696>

HARBORNE, J. *Phytochemical methods*. New York - USA: British Library, 1980.p.18

HEALY, B., et al. “Bisphenol A exposure pathways in early childhood: Reviewing the need for improved risk assessment models”. A: *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* [en línea]. Nature Publishing Group, 2015, 25(6), pp.544-556. [Consulta: 20 Octubre 2017]. ISSN 1559-0631. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/jes.2015.49>

HU, D., et al. “Quaternized chitosan/polyvinyl alcohol/sodium carboxymethylcellulose blend film for potential wound dressing application”. A: *Wound Medicine* [en línea], 2017, 16, pp.15-21. [Consulta: 2 Octubre 2017]. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S221390951630043X>

JOVANOVIĆ, D., et al. “Actividad antimicrobiana de coberturas y películas de quitosano contra *Listeria monocytogenes* en rábano negro”. A: *Revista Argentina de Microbiología*. 2016, 48(2), pp.128-136. [Consulta: 4 Octubre 2017]. ISSN 03257541. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754116000080>

JRIDI, M., et al. “Physical, structural, antioxidant and antimicrobial properties of gelatin-

chitosan composite edible films”. A: *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea] 2014, 67, pp.373-379. [Consulta: 6 Noviembre 2017]. ISSN 18790003. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014002268?via%3Dihub>

KANATT, S., et al. “Chitosan glucose complex - A novel food preservative”. A: *Food Chemistry* [en línea]. 2008, 106(2), pp.521-528. [Consulta: 18 Noviembre 2017]. ISSN 03088146. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607006103>.

KAYA, M., et al. “Incorporation of sporopollenin enhances acid–base durability, hydrophobicity, and mechanical, antifungal and antioxidant properties of chitosan films”. A: *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* [en línea], 2016, 47, pp.236-245. [Consulta: 20 Octubre 2017]. ISSN 1226086X. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1226086X16304774>

LEBRETON, L., et al. “River plastic emissions to the world’s oceans”. A: *Nature Communications* [en línea], 2017, 8, pp.1-9. [Consulta: 20 Agosto 2017]. ISSN 2041-1723. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms15611>.

LIU, J. et al. “Preparation and characterization of protocatechuic acid grafted chitosan films with antioxidant activity”. A: *Food Hydrocolloids* [en línea], 2017, 63, pp.457-466. [Consulta: 18 Octubre 2017]. ISSN 0268005X. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16304660?via%3Dihub>

LIU, J. et al. “Protocatechuic acid grafted onto chitosan: Characterization and antioxidant activity”. A: *International Journal of Biological Macromolecules* [en línea]. 2016, 89, pp.518-526. [Consulta: 18 Octubre 2017]. ISSN 18790003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.089>

LLACUNA, L. & MACH, N. “Papel de los antioxidantes”. A: *Nutrición Humana y Dietética* [en línea], 2013, 17(1), pp.34-44. [Consulta: 3 Octubre 2017]. ISSN 21731292. Disponible a: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2173129212700674?via%3Dihub>

MALINCONICO, M. *Soil Degradable Bioplastics for a Sustainable Modern Agriculture* [en línea]. Pozzuoli, Italy, 2017. [Consulta: 10 Octubre 2017]. ISBN 978-3-662-54128-9. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-54130-2>

MARGUERITE, R. “Chitin and chitosan : Properties and applications”. A: *Progreso en Ciencia de Polímeros*. [en línea], 2006, (Francia) 31, pp.603-632. [Consulta: 22 Octubre 2017]. Disponible en: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670006000530

MIRANDA, M. *Farmacognosia y Productos Naturales : Normas Ramales de Drogas Crudas Y extractos Y Tinturas*. 6^{ta} ed. Habana- Cuba: F. Varela,2006. pp.32-62

MONGE, D. Actividad cicatrizante de los extractos metanólicos de *Justicia chlorostachya* y *Plectranthus amboinicus* mediante ensayos in vitro de inhibición de Hialuronidasa y veneno de cobra (naja naja). (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, (Riobamba-Ecuador). 2015, pp.7-8. [Consulta: 15 Octubre 2017]. Disponible en: <http://dspace.espace.edu.ec/bitstream/123456789/4426/1/56T00558%20UDCTFC.pdf>

MORADI, M., et al. “Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract”. A: *LWT - Food Science and Technology* [en línea], 2012,46(2), pp.477-484. [Consulta: 18 Noviembre 2017]. ISSN 00236438. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643811003756?via%3Dihub>

MOURA, C., et al. “Chemical Engineering and Processing : Process Intensification Evaluation of molar weight and deacetylation degree of chitosan during chitin deacetylation reaction : Used to produce biofilm”. A: *Chemical Engineering & Processing: Process Intensification* [en línea], 2011, 50 (4), pp.351-355. [Consulta: 26 Agosto 2017]. ISSN 0255-2701. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0255270111000699?via%3Dihub>

NARVÁEZ, P. Paquete turístico: la ruta del agua en Puyo. [en línea]. (Tesis pregrado). Universidad del Azuay, Facultad de filosofía, Escuela de turismo. (Azuay –Ecuador), 2009, pp. 42-46. [Consulta: 13 Octubre 2017]. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/855/1/07160.pdf>

NESIC, A., et al. “Películas de quitosano triclosán para uso potencial como bolsas bioantimicrobianas en el sector de la salud” .A: *Materials Letters* [en línea], 2017, 186, pp.368-371. [Consulta: 25 Agosto 2017]. ISSN 0167-577X. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167577X16316329?via%3Dihub>

OCHOA, A., et al. “Caracterización física, físico-química y química de extractos totales de

hojas frescas de *Petiveria alliacea* L.con acción antimicrobiana”. A: *Redalyc* [en línea], 2013, 44 (1), p.9. [Consulta: 12 Septiembre 2017]. ISSN: 1870-0195. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/579/57929946007.pdf>.

OJAGH, S., et al. “Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water”. A: *Food Chemistry* [en línea], 2010, 122 (1), pp.161-166. [Consulta: 15 Noviembre 2017]. ISSN 03088146. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814610001998?via%3Dihub>

PAN, Y., et al. “Antioxidant activity of microwave-assisted extract of longan (*Dimocarpus Longan* Lour.) peel”. A: *Food Chemistry* [en línea],2008, 106(3), pp.1264-1270 [Consulta: 16 Noviembre 2017] ISSN 03088146. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607007194>

PAZMIÑO, C. Determinación de la actividad hipoglicemiante del extracto hidroalcoholico de *Justicia chlorostachya* Leonard (Insulina). *En ratones con hiperglicemia inducida*. [en línea]. (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, (Riobamba-Ecuador), 2011. pp.25-67 [Consulta: 1 Agosto2017] Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1990/1/56T00298.pdf>

PENG, Y. & LI, Y. “ Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films”. A: *Food Hydrocolloids* [en línea],2014, 36, pp. 287-293. [Consulta: 12 Noviembre 2017] ISSN 0268005X.Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.10.013>

PEÑARRIETA, J., et al. “Phenolic compounds in food”. A: *Bolivian Journal of Chemistry*. 2014 (Bolivia) 31(2), pp.68-81.[Consulta: 12 Agosto2017]. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0250-54602014000200006

PILLA, S. *Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications*. New Jersey: 2011. pp.1-348

RIOS, M., et al. *Plantas útiles del Ecuador aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito- Ecuador : Abya-Yala 2007, p. 401

SE-KWON, K. *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications* [en línea]. London- Inglaterra: CRC Press, 2011. [Consulta: 5 Octubre 2017]

disponible en: http://libgen.io/_ads/31F2679349909E93A119759D927E0D74

SHURVELL, H. “Spectra – Structure Correlations in the Mid-and Far-infrared”. [en línea], 2000, (Canadá), pp.1-34. [Consulta: 7 Noviembre 2017]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0470027320.s4101/pdf>.

SENPLADES. *Plan Nacional Buen Vivir 2013-2017* [en línea]. 2013. pp.135-137 [Consulta: 9 Noviembre 2017]. Disponible a: <http://documentos.senplades.gob.ec/Plan Nacional Buen Vivir 2013-2017.pdf>.

SIEDENTOPP, U. “El cacao, planta medicinal y de deleite”. A: *Revista Internacional de Acupuntura*. 2009, 3(4), pp.197-200, [Consulta: 27 Agosto 2017]. ISSN 18878369. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1887836909731606>

STALIKAS, C. “Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids”. A: *Journal of Separation Science* [en línea]. 2007, 30(18), pp.3268-3295. [Consulta: 15 Agosto 2017]. ISSN 16159306. Disponible a: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.200700261/epdf>.

SYED, O. et al. PT. “The protective role of plant biophenols in mechanisms of Alzheimer’s disease”. A: *The Journal of Nutritional Biochemistry* [en línea], 2017, 47, pp.1-20. [Consulta: 15 Agosto 2017]. ISSN 0955-2863. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286316307343?via%3Dihub>

TASTAN, Ö., et al. “Understanding the effect of formulation on functionality of modified chitosan films containing carvacrol nanoemulsions”. A: *Food Hydrocolloids*. 2016, 61, pp.756-771. [Consulta: 12 Octubre 2017] ISSN 0268005X. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16302867>

UNE. *Envases y embalajes. Requisitos de los envases y embalajes valorizables mediante compostaje y biodegradación. Programa de ensayo y criterios de evaluación para la aceptación final del envase o embalaje:* [en línea]. Madrid-España: AENOR, 2001. [Consulta: 5 Octubre 2017] Disponible en: <http://www.aenor.es/aenor/normas/normas/fichanorma.asp?tipo=N&codigo=N0024465>.

VALLS, V. El papel antioxidante de los alimentos de origen vegetal. Vitaminas y Polifenoles. A: *Universidad de Valencia* [en línea]. 2009, 2(1), pp.1-9. [Consulta: 5 Octubre 2017]. ISSN

0021-8561. Disponible en:
http://revista.nutricion.org/hemeroteca/revista_agosto_03/Funcionales/vegetales,vitaminas,polifenoles.pdf.

VAN DEN B., et al. “Chitosan films and blends for packaging material”. A: *Carbohydrate Polymers* [en línea], 2014, 116, pp.1-6. [Consulta: 2 Agosto 2017]. ISSN 0144-8617. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714007231?via%3Dihub>

VELEZ, F. Actividad cicatrizante in vivo de los extractos metanólicos de *Justicia chlorostochya* y *Plectranthus amboinicus* en ratones diabéticos inducidos mediante estreptozotocina. [en línea]. (Tesis pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, (Riobamba-Ecuador). 2015. p.39 [Consulta: 22 Septiembre 2017]. Disponible en:
<http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/3943/1/56T00515%20UDCTFC.pdf>

VILLALÓN, U., et al. Pirólisis catalítica de pebd a carbono e hidrocarburos. [en línea], 2016, 5(9), pp.217-221. [Consulta: 26 Julio 2017] Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/juan_quintana_melgoza/publication/295906274_pirolisis_catalitica_de_pebd_a_carbono_e_hidrocarburos/links/56cfc48c08ae059e37597ad0/pirolisis-catalitica-de-pebd-a-carbono-e-hidrocarburos.pdf.

WANG, L., et al. “Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols”. A: *Food Hydrocolloids* [en línea], 2013, 32(1), p.35-41. [Consulta: 5 Julio 2017] .ISSN 0268005X. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X12002998?via%3Dihub>

YUAN, G., et al . “Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems”. *Food Research International*. [en línea], 2016, (China), 89(1). pp.117-128. [Consulta: 29 Septiembre 2017]. ISSN 09639969 . Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096399691630429X?via%3Dihub>

ANEXOS

Anexo A: Selección, limpieza secado y molienda de la especie vegetal *Justicia chlorostachya* L.



Gráfico 1-A: Limpieza de la especie vegetal.



Gráfico 2-A: Secado de la especie vegetal en estufa a 50°C



Gráfico 3-A: Molienda de la especie vegetal.



Gráfico 4-A: Especie vegetal molida.

Anexo B: Obtención de los extractos



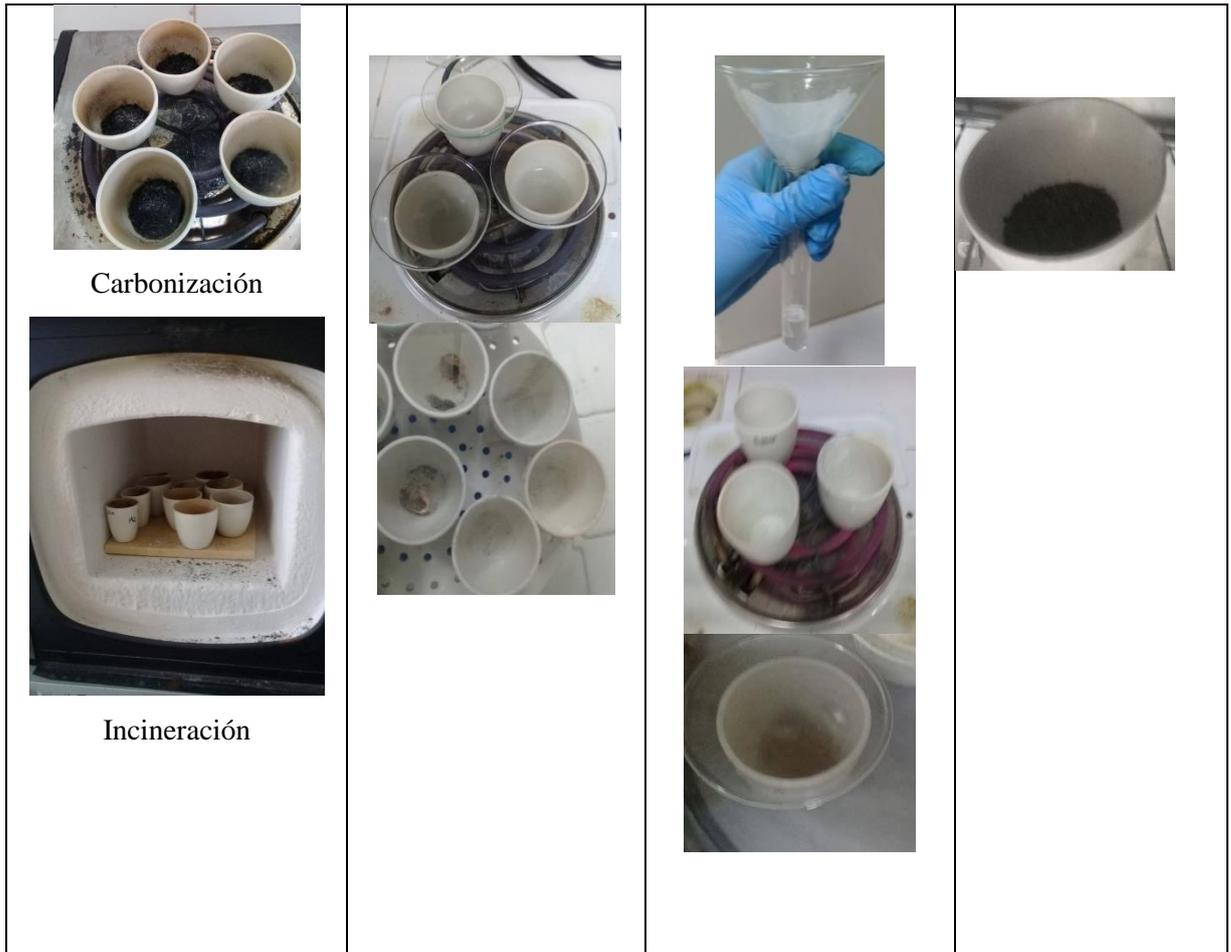
Gráfico 1-B: Filtrado.



Gráfico 2-B: Concentración del extracto en el rotavapor a 60°C.

Anexo C: Control de calidad de la materia prima

Cenizas totales	Cenizas solubles en agua	Cenizas insolubles en ácido clorhídrico	Humedad



Anexo D: Tamizaje Fitoquímico

Extracto etéreo	Extracto alcohólico	Extracto acuoso
		
 <p>Sudan</p>	 <p>Catequinas</p>	 <p>Wagner</p>



Liebermann-Buchard



Cl_3Fe



Cl_3Fe



Wagner



Wagner



Mayer



Mayer



Dragendorff



Fehling



Resinas



Baljet

Anexo E: Métodos generales para el análisis de extractos

Sólidos totales	Índice de refracción	pH
  	 <p data-bbox="730 629 908 663">Refractómetro</p>	

Anexo F: Determinación de compuestos fenólicos del extracto de *Justicia Chlorostachya* L.



Anexo G: Elaboración de los bioplásticos



Gráfico 1-G: Quitosano



Gráfico 2-G: Glicerol
(Plastificante)



Gráfico 3-G: Extracto
hidroalcohólico.



Gráfico 4-G: Mezcla de los Componentes y el extracto.



Gráfico 5-G: Desgasificación.



Gráfico 6-G: Solución formadora de bioplásticos en la caja Petri.



Gráfico 7-G: Secado en estufa a 50°C con HR: 25%.

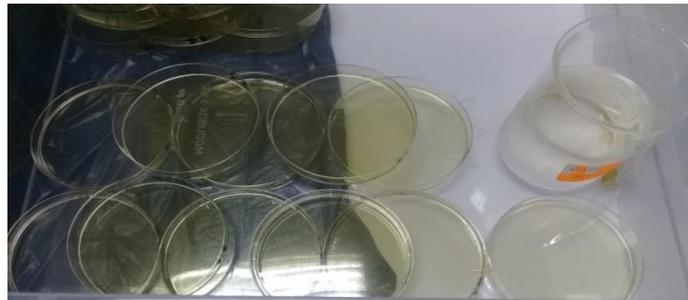


Gráfico 8-G: Bioplásticos colocado en recipiente hermético a temperatura ambiente y HR: 75%.

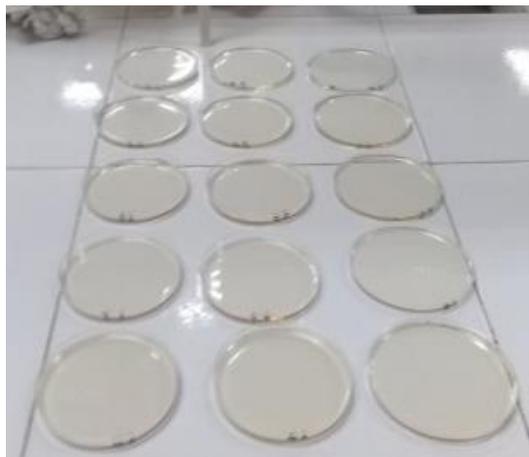


Gráfico 9-G: Bioplásticos a diferentes concentraciones de extracto.

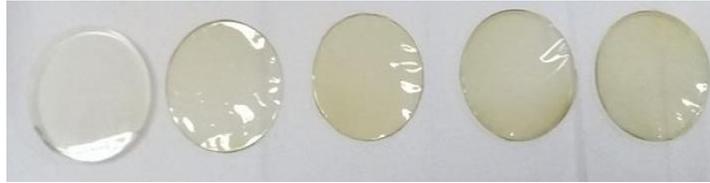


Gráfico 10-G: Bioplásticos de control y de concentración de extracto al 10, 20, 30 y 40 %.

Anexo H: Pruebas para determinar la calidad del bioplástico.

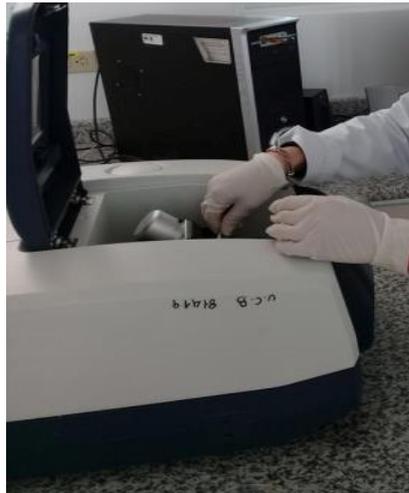


Gráfico 1-H: Espectroscopia IR.



Gráfico 2-H: Espesor del bioplástico
(Micrómetro digital)



Gráfico 3-H: Determinación del contenido de humedad.



Gráfico 4-H: Solubilidad en agua.



Gráfico 5-H: Permeabilidad al vapor de agua.

Anexo I: Preparación de la solución de extracto del bioplástico

Día 1	Día 6	Día 12	Día 18	Día 24
-------	-------	--------	--------	--------



Anexo J: Determinación del contenido fenólico, flavonoides y la actividad antioxidante.

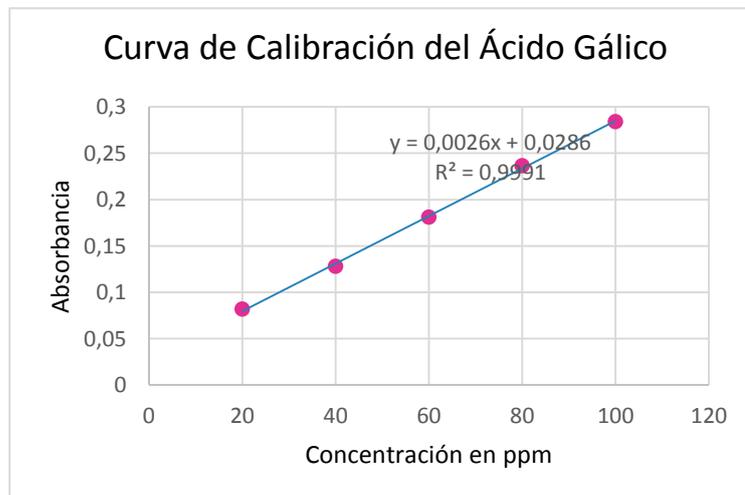
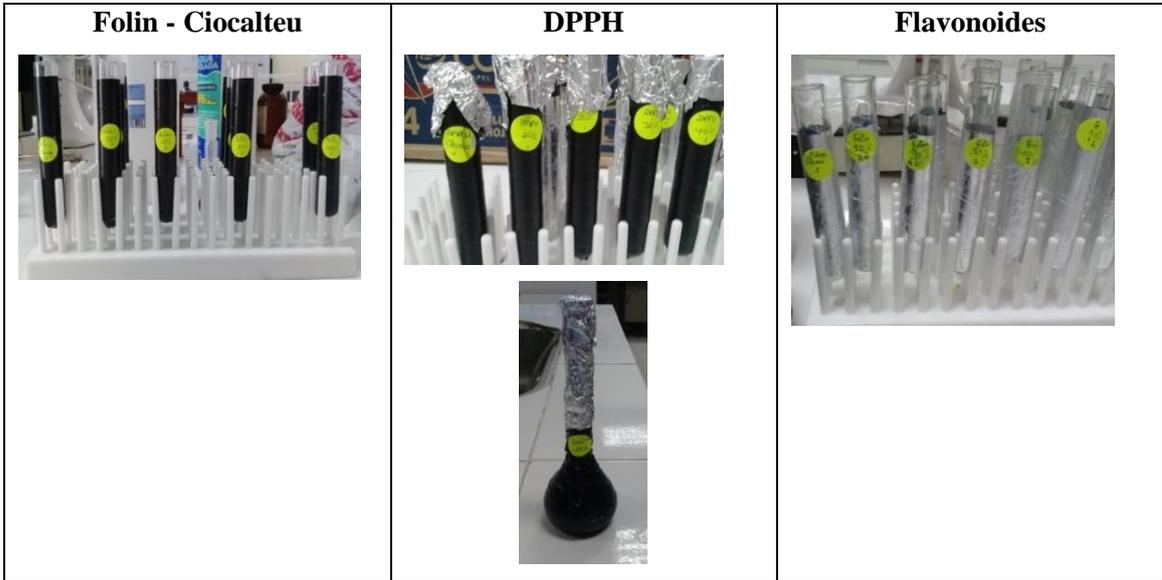


Gráfico 1-J: Curva de calibración del ácido gálico

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

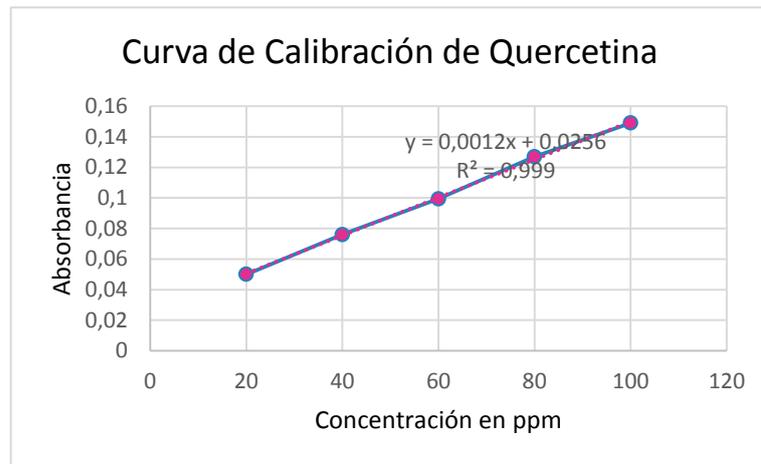


Gráfico 2-J: Curva de calibración de la quercetina.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

Anexo K: Análisis espectroscópico de los bioplásticos

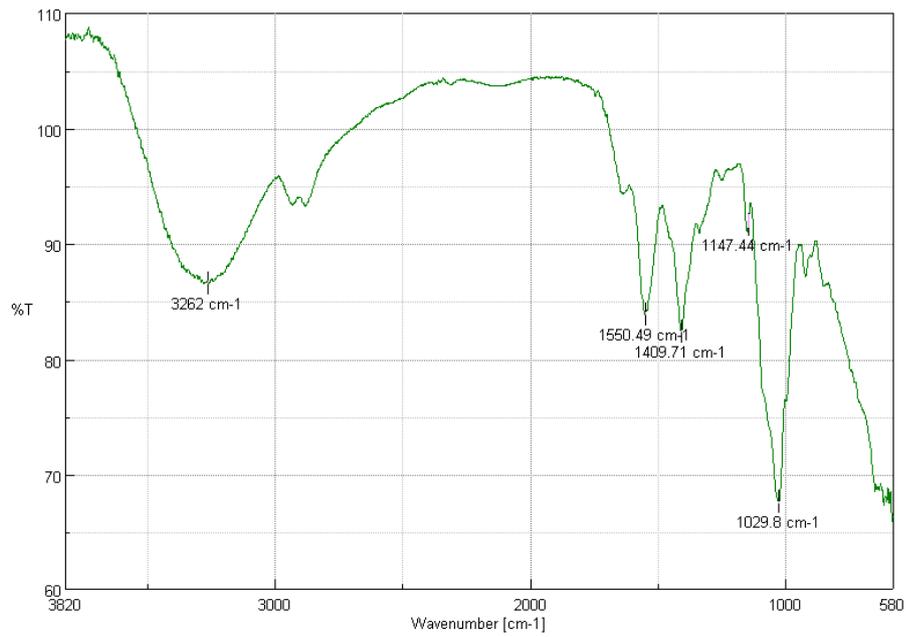


Gráfico 1-K: Espectro IR del bioplástico control (sin adición de extracto)

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

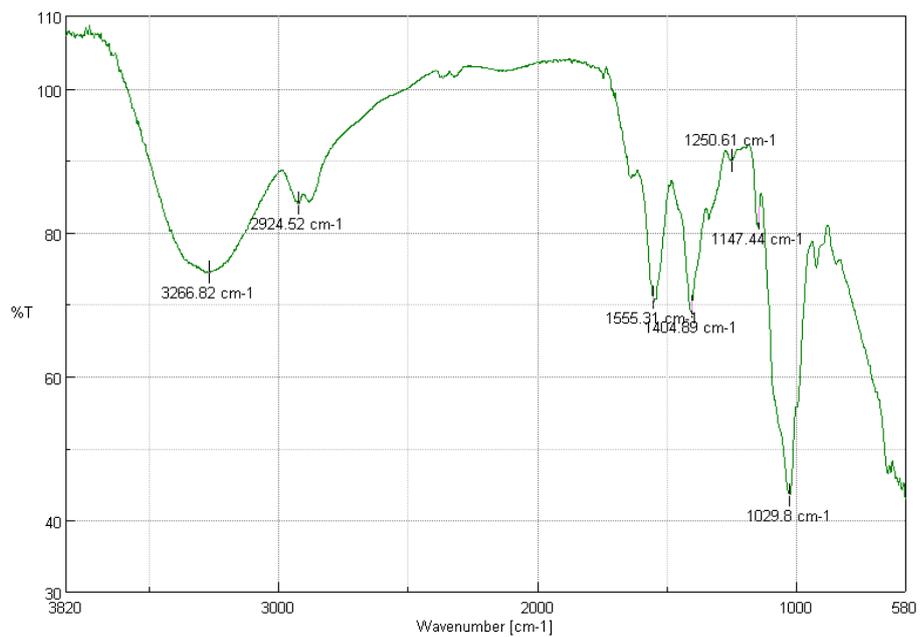


Gráfico 2-K: Espectro Ir al 10 % de extracto de la especie vegetal.

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

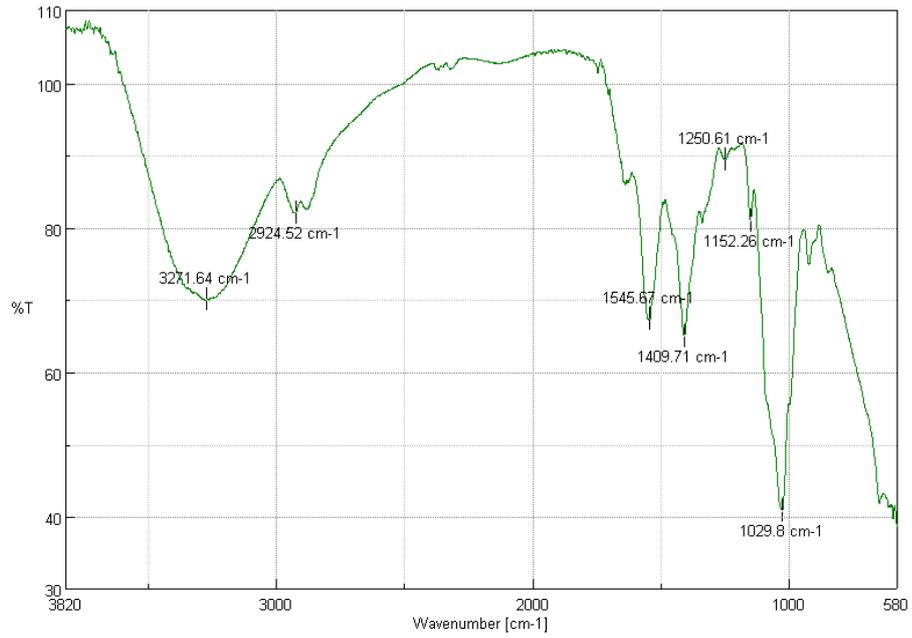


Gráfico 3-k: Espectro IR al 20 % de extracto de la especie vegetal.

Realizado por: Jessica Monar, 2017.

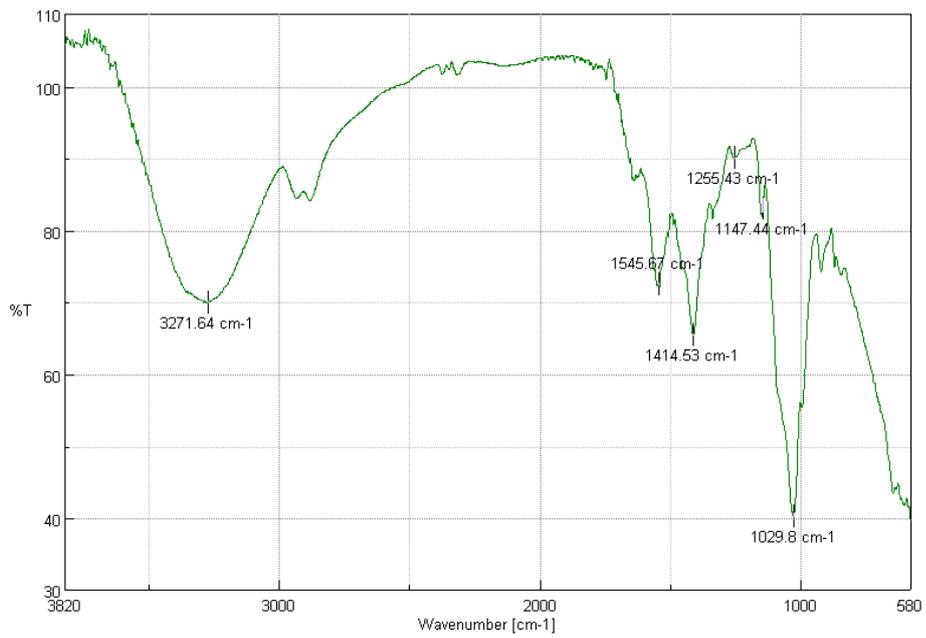


Gráfico 4-K: Espectro IR al 30 % de extracto de la especie vegetal.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

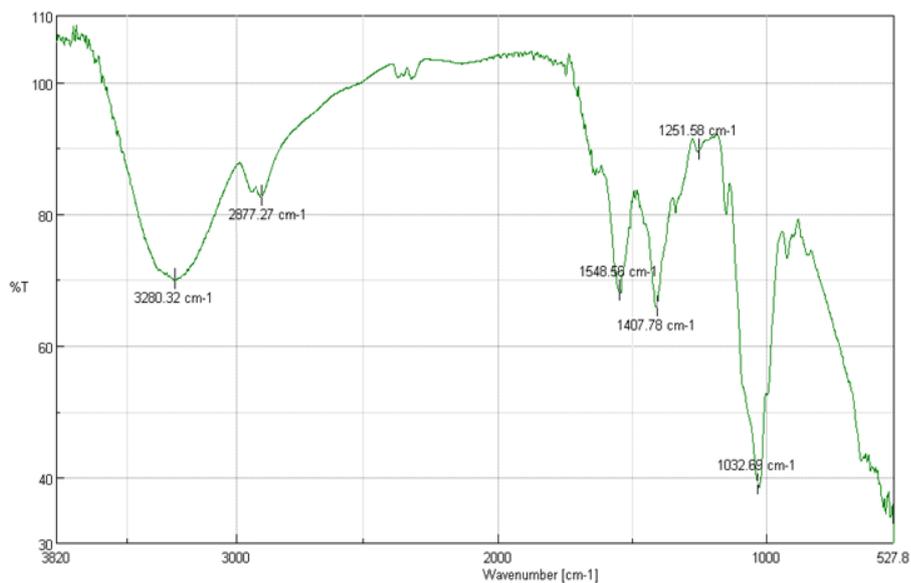


Gráfico 5-K: Espectro IR al 40% de extracto añadido de *Justicia chlorostachya* L.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

Anexo L: Medición de grosor y absorbancia de los bioplásticos.

Bioplástico	Grosor (mm)	Absorbancia (600nm)
Blanco	0.146 ± 0.014	0.124 ± 0.0018
10%	0.077 ± 0.011	0.128 ± 0.002
20%	0.070 ± 0.019	0.140 ± 0.011
30%	0.063 ± 0.010	0.145 ± 0.005
40%	0.067 ± 0.013	0.170 ± 0.004

Realizado por: Jessica Monar, 2017

Anexo M: Resultados de la permeabilidad al vapor de agua expresado en mg.

Bioplástico	0	2	4	6	8	10
Blanco	13395,967	13423,167	13428,533	13443,733	13456,2	13469,2
10%	13100,83	13115,5	13136,06	13147,07	13157,5	13165,167
20%	13229,533	13242,868	13261,568	13277,1	13291,333	13305,533
30%	13222,767	13254,6	713275,966	13283,868	13296,7	13305,133
40%	13057,733	13080,133	13089,5	13102,9	13114,3	13129,7667

Realizado por: Jessica Monar, 2017

Anexo N: Análisis estadístico de los parámetros de control de calidad de los bioplásticos

Pruebas de los efectos inter-sujetos					
Variable dependiente: Contenido de humedad					
Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	483,435 ^a	8	60,429	107,159	,000
Intersección	14758,931	1	14758,931	26171,926	,000
densidad	1,576	2	,788	1,397	,318
opacidad	,000	0	.	.	.
Bioplástico	14,611	2	7,305	12,954	,007
densidad* opacidad	,000	0	.	.	.
densidad* bioplástico	,132	1	,132	,234	,646
opacidad * bioplástico	,000	0	.	.	.
densidad* opacidad* bioplástico	,000	0	.	.	.
Error	3,384	6	,564		
Total	17417,187	15			
Total corregida	486,819	14			

a. R cuadrado = ,993 (R cuadrado corregida = ,984)

Gráfico 1-N: Análisis de varianza univariante, prueba de efectos inter-sujetos

Realizado por: Jessica Monar, 2017

Contenido de humedad						
Duncan ^{a,b}						
BIOPLASTICO	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
40%	3	27,1600				
30%	3		29,6333			
20%	3			32,2467		
10 %	3				35,4333	
blanco	3					43,5067
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias de los grupos de subconjuntos homogéneos.
 Basadas en las medias observadas.
 El término de error es la media cuadrática(Error) = ,564.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000
 b. Alfa = 0,05.

Gráfico 2-N: Prueba post-hoc Duncan subconjuntos homogéneos.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

ANOVA de un factor					
Solubilidad en agua (%)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	8,081	1	8,081	10,073	,050
Intra-grupos	2,407	3	,802		
Total	10,487	4			

Gráfico 3-N: ANOVA de un factor respecto a WS.

Realizado por: Jessica Monar, 201

ANOVA de un factor					
Permeabilidad al vapor de agua (gmm/m ² diakPa)					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	7,148	2	3,574	51,057	,019
Intra-grupos	,140	2	,070		
Total	7,288	4			

Gráfico 4-N: Prueba de ANOVA de un factor respecto al WVP.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

ANOVA de un factor					
Contenido fenólico total					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	164332,420	2	82166,210	81,143	,000
Intra-grupos	22277,299	22	1012,605		
Total	186609,719	24			

Gráfico 5-N: Prueba de ANOVA de un factor del contenido fenólico total.

Realizado por: Jessica Monar, 2017

ANOVA de un factor					
Flavonoides					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4311,636	2	2155,818	71,284	,000
Intra-grupos	665,343	22	30,243		
Total	4976,979	24			

Gráfico 6-N: Prueba de ANOVA de un factor del contenido de flavonoides

Realizado por: Jessica Monar, 2017

ANOVA de un factor					
Actividad antioxidante					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3909,666	4	977,417	7,613	,001
Intra-grupos	2567,616	20	128,381		
Total	6477,282	24			

Gráfico 7-N: Prueba de ANOVA de un factor

Realizado por: Jessica Monar, 2017

