

dx.doi.org/10.17488/RMIB.38.1.20

Membrana de Quitosano con Aceites Esenciales de Romero y Árbol de Té: Potencial como Biomaterial

Membrane of chitosan with essential oils of Romero and Tree of Tea: Potential as biomaterial

L. Quihui-Cota¹, G.G. Morales-Figueroa¹, E. Valbuena-Gregorio², J. C. Campos-García², N.P. Silva-Beltrán², M.A. López-Mata²

¹Departamento de Nutrición Pública y Salud, Coordinación de Nutrición, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carretera al Ejido la Victoria Km 0.6, Apdo. Postal 83304, Hermosillo, Sonora.

²Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Sonora, Campus Cajeme, Blvd. Bordo Nuevo S/N, Apdo. Postal 85040, Antiguo Providencia, Cd. Obregón, Sonora, México.

RESUMEN

El quitosano (CH) tiene propiedades hemostáticas, cicatrizantes y estimulantes del sistema inmune del hospedero contra infecciones virales y bacterianas. Además es biodegradable, no tóxico, antimicrobiano, biocompatible y filmogénico. Estas propiedades han sido utilizadas para acarrear y liberar compuestos bioactivos para sus posibles usos en la salud humana. Por otro lado, los compuestos bioactivos como los aceites esenciales de gran volatilidad como romero (RMO) [*Rosmarinus officinalis*] y árbol de té (TTO) [*Melaleuca alternifolia*], pueden ser alternativa importante de uso como antioxidantes y antimicrobianos que podrían inducir cambios favorables en la membrana de CH. Por lo tanto, se incorporaron aceites esenciales de TTO y RMO (0.25, 0.50 y 1.00% v/v) en membranas de CH por el método de casting y se evaluaron su solubilidad, PVA, transparencia y capacidad de bloqueo de la luz ultravioleta, capacidad antioxidante y de protección del eritrocito humano. RMO y TTO redujeron la solubilidad (28-58%) y PVA (entre 28-58%) de las membranas de CH. Todas las membranas fueron amarillas, ligeramente opacas y con capacidad de bloquear la luz ultravioleta. También, las membranas mostraron relativa baja capacidad antioxidante por el radical ABTS (\approx 6 at 9 %), pero con excelente efecto protector sobre el eritrocito humano ($>$ 63 %).

PALABRAS CLAVE: Biomateriales, quitosano, aceites esenciales de romero, árbol de té.

ABSTRACT

Chitosan (CH) has hemostatic properties and accelerated healing ability to stimulate the host immune system against viral and bacterial infections. It is also biodegradable, nontoxic, antimicrobial, biocompatible, and capable of forming membranes and to carry and to release bioactive compounds. These properties of CH can be useful to carry some volatile essential oils having bioactive compounds (antioxidants and antimicrobials) with potential application in human health as those as rosemary (RMO) [*Rosmarinus officinalis*] and tea tree (TTO) [*Melaleuca alternifolia*]. These essential oils were incorporated into the chitosan by the casting method in this study. The physical properties (solubility, PVA, transparency and blocking ultraviolet light) of these membranes with TTO and RMO (0.25, 0.50 and 1.00% v/v), antioxidant capacity and protection human erythrocyte were evaluated. TTO and RMO reduced solubility (28-58%) and PVA (between 28-58%) of CH membranes. All membranes were yellow, slightly opaque and they were able to block the ultraviolet light. Membranes also showed relatively low antioxidant capacity by the radical ABTS (\approx 6 at 9%), but it was accompanied by an excellent protective effect on the human erythrocyte ($>$ 63%).

KEYWORDS: Biomaterials, Chitosan, Essential oils of Rosemary and Tea Tree.

Correspondencia

DESTINATARIO: L. Quihui-Cota

INSTITUCIÓN: Departamento de Nutrición Pública
y Salud, Coordinación de Nutrición, Centro de
Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

DIRECCIÓN: Carretera al Ejido la Victoria Km 0.6, Apdo.
Postal 83304, Hermosillo, Sonora

DESTINATARIO: lquihui@ciad.mx

Fecha de recepción:

12 de octubre de 2016

Fecha de aceptación:

23 de diciembre de 2016

INTRODUCCIÓN

Previos estudios han revelado que el quitosano (CH) tiene propiedades hemostáticas, acelerantes de la cicatrización y estimulantes del sistema inmune del hospedero contra infecciones virales y bacterianas^[1]. El CH es un carbohidrato conformado por unidades β -(1-4)-D-glucosamina y β -(1-4)-N-acetil-D-glucosamina, que se obtiene por la desacetilación termo-alcalina de la quitina y es considerado un biopolímero biodegradable, no tóxico, antigénico, antimicrobiano, biocompatible y con capacidad de formar membranas^[2]. Debido a estas propiedades, el CH fue aprobado para su uso como biomaterial por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés)^[3]. Actualmente, se han usado diferentes tipos de materiales como membranas, micro y nanopartículas, andamios y apósitos para heridas con potencial uso en el área biomédica. Debemos mencionar que una particularidad importante del CH es que puede acarrear y liberar compuestos bioactivos^[4] y esto tiene gran importancia cuando diversos estudios revelan la existencia de aceites esenciales con compuestos bioactivos con potenciales aplicaciones en la salud humana. Como ejemplos podemos mencionar los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (RMO) y el árbol de té (TTO) [*Melaleuca alternifolia*]. El primero es comúnmente conocido como romero y contiene una serie de compuestos bioactivos como diterpenos, carnosol, ácido carnósico y ácido rosmarínico, a los que se le han atribuido propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes^[5]. El aceite esencial del segundo, es usado como material bioactivo seguro y parece tener propiedades antibacteriales, antiinflamatorias, anticancerígenas y acaricidas, atribuidos principalmente a la presencia de terpineno-4-ol, γ -terpineno y α -terpieno^[6]. Sin embargo, debido a su alta volatilidad y reactividad no se les ha reconocido como materiales de utilidad en el campo de la salud^[7]. Por ello, las propiedades de estos aceites de RMO y TTO podrían aprovecharse de manera óptima si son incorporados a una membrana de CH, que a su vez funcionaría como reservorio de RMO y TTO para su uso como apósitos para

heridas. Considerando lo anterior, este estudio incorporó los aceites esenciales de RMO y TTO a membranas de CH y evaluó sus propiedades físicas (degradabilidad, permeabilidad al vapor de agua, color, transparencia y capacidad de bloqueo de la luz ultravioleta), capacidad antioxidante y de protección del eritrocito humano.

METODOLOGÍA

Preparación y caracterización del CH

Para la obtención del CH se utilizó el caparazón del camarón utilizando el método establecido por Khanafari *et al.*, 2008^[8], con algunas modificaciones. Para iniciar, los caparazones de los camarones fueron lavados y posteriormente secados a 50 °C durante 24 h y posteriormente molidas en una licuadora convencional, hasta obtener las formas de hojuelas. Posteriormente, se aplicó un proceso de desproteinización a las hojuelas, para ello fueron colocadas en una solución de hidróxido de sodio (5% p/v) en una proporción de 1:30 p/v a 90 °C por 2 h. Transcurrido el tiempo, se ajustó el pH 7 y se realizó un proceso de desmineralización con HCl 2N (proporción 1:10 p/v) por 2 h. Por último se realizó un proceso de decoloración con H₂O₂ al 3% v/v (proporción 1:7 p/v), seguido por un ajuste de pH y secado en condiciones similares a las iniciales, para obtener la quitina. El CH se obtuvo por desacetilación termo-alcalina de la quitina de camarón. Un gramo de quitina fue homogenizado con 15 mL de NaOH (50 % p/v) a 95 °C por 2 h^[9] y fue caracterizado en base a su peso molecular y el grado de acetilación. Para la primera determinación, una muestra de CH fue solubilizada en ácido acético (0.25 M) hasta obtener una concentración de 4 g/L. Esta solución fue inyectada en un HPLC-SEC equipado con una columna ultrahydrogel™ 500 (7.8 x 300 mm) y una detector de dispersión de luz PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, US). La separación se realizó con una bomba isocrática (HP serie 1100) ajustada a un flujo de 0.3 mL/min con la solución de ácido acético arriba descrita. El peso molecular promedio del CH fue de 128 kDa.

Por otro lado, el grado de N-acetilación (DA) del CH fue determinado en un espectrómetro ATR-FTIR Perkin-Elmer (Connecticus, US) en modo de absorbancia. El espectro de la muestra fue medido a 24 °C y 35% de humedad relativa, con una resolución de 4 cm^{-1} . El grado DA fue estimado utilizando las bandas a 1320 y 1420 cm^{-1} . El CH medido mostró un grado de acetilación de 34 %. Los resultados de la caracterización del peso molecular y el grado de CH fueron previamente reportados por nuestro grupo de trabajo ^[10].

Preparación de la membrana de CH con RMO y TTO

Se preparó una solución de CH al 2 % (p/v) en ácido acético (1 % v/v) y fue homogenizada por 4 min a 15,500 rpm (Ika Ultra-turrax, Alemania). Una vez homogenizada, se adicionó glicerol como plastificante (500 μ L/g of CH) y se volvió a homogenizar bajo las mismas condiciones. Ya obtenida la solución de CH, se agregaron los aceites de RMO (SARC USA; densidad relativa 0.903 g/cm^3) y TTO (SARC USA; densidad relativa 0.898 g/cm^3 a 25 °C) como emulsiones [(1% v/v de tween 80, etanol-agua (50 % v/v), RMO y TTO] en concentraciones de 0 (control), 0.5, 1.0 y 1.5 % (v/v). Posteriormente estas soluciones fueron colocadas en cajas Petri y secadas a 37 °C por 24 h hasta la formación de las membranas (Figura 1).

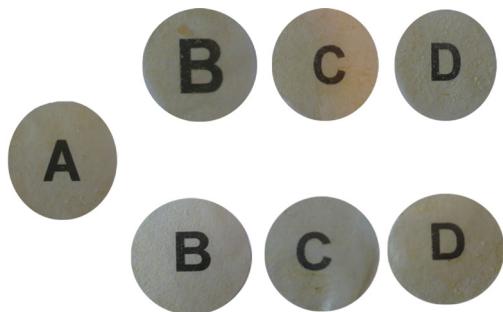


FIGURA 1. Imágenes de membranas de CH incorporadas con RMO y TTO. (A) control. Parte superior (B) RMO-0.25 %, (C) RMO-0.50 % y (D) RMO-1.00 %. Parte inferior; (B) TTO-0.25 %, (C) TTO-0.50 %, (D) TTO-1.00 %.

Grosor

El grosor de las membranas fue medido con un micrómetro manual (Mitutoyo, Japón) a una precisión de 0.025 mm. Posteriormente se realizó aleatoriamente una repetición de 5 mediciones para cada una de las membranas. El grosor fue utilizado para calcular la transparencia y la permeabilidad al vapor de agua.

Solubilidad en agua (degradabilidad)

La determinación de solubilidad se realizó de acuerdo a lo publicado por Casariego *et al.*, 2009 ^[11]. Las membranas se cortaron en cuadros de 20 x 20 mm y fueron colocadas en un horno al vacío (70°C, 35 kPa x 24 h) para obtener el peso seco de la membrana. Posteriormente, las membranas fueron inmersas en 10 mL de agua tridestilada en cajas Petri y mantenidas a 25°C por 24 h con agitación ocasional. Una vez transcurrido el tiempo, se secaron de nuevo hasta obtener un peso constante (mismas condiciones ya descritas), para determinar el peso de la materia seca insoluble en agua. La solubilidad se calculó de la siguiente manera con la Ecuación (1).

$$\text{Solubilidad} = \left(\frac{Mi - Mf}{Mi} \right) 100 \quad (1)$$

Donde Mi representa a la masa inicial y Mf la masa final.

Medición de la permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA se determinó por gravimetría de acuerdo al método ASTM E96-92 ^[12]. Para ello, las películas a probar fueron colocadas y selladas en la parte superior de una copa de vidrio de 50 mL, la cual contenía 10 mL de agua destilada (100 % HR; 3.168 kPa de PVA a 25°C). Posteriormente, las películas fueron colocadas en un desecador con sulfato de calcio anhídrico a 25°C y 0% de HR (0 kPa de PVA). Las copas fueron pesadas en intervalos de 3 h por 12 h en condiciones ambientales uniformes y circulación de aire constante. Para ello, se usó

un ventilador miniatura dentro del desecador. El peso perdido de la copa se graficó con respecto al tiempo, para estimar la pendiente mediante la ecuación de la recta (coeficiente de correlación fue de 0.99). Una vez calculada la pendiente se determinó la razón de transmisión de vapor de agua (RTVA) mediante la siguiente Ecuación (2).

$$RTVA = \frac{\text{Pendiente}}{\text{Área de la Película}} \quad (2)$$

La PVA de las membranas se calculó dividiendo la RTVA por la diferencia de las presiones parciales dentro (PA1) y fuera de la copa (PA2) y multiplicando por el grosor promedio de la membrana (G) como se expresa en (3).

$$PVA = \frac{RTVA}{(PA1 - PA2)} \times G \quad (3)$$

Propiedades ópticas

El color y la transparencia se determinaron con un espectrofotómetro UV-vis Marca Cintra 10e (Australia). Para la medición de color se seleccionaron tres membranas de cada concentración, de las cuales se registró la lectura de cinco puntos de muestreo al azar. El color de la membrana se expresó en base al modelo de CIE L^* (luminosidad) a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul). La transparencia se determinó por espectrofotometría utilizando el método establecido por Han y Floros, 1997^[13]. La transmitancia fue leída a 600 nm y la transparencia de la membrana fue calculada (4).

$$\text{Transparencia} = \log (T600/G) \quad (4)$$

Donde $T600$ es la transmitancia a 600 nm y G representa el grosor de la membrana (mm).

También se determinó el comportamiento de las propiedades de transmisión de la luz UV (200-400 nm).

Actividad antioxidante (radical ABTS)

Se tomaron 50 mg de cada membrana y se homogenizaron en 5 mL de metanol al 80% (v/v) usando un homogeneizador a 5°C por 5 minutos a 11,000 rpm. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 16,000 g x 10 min a 5°C, y el sobrenadante colectado y fue filtrado usando papel filtro Whatman No 1. Los extractos de las películas, fueron utilizados para el ensayo de ABTS [ácido 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzotiazolina-6-sulfónico)] y para la evaluación del efecto protector sobre eritrocitos humanos. La actividad antioxidante fue realizada por el ensayo de decoloración del radical cationoico ABTS según lo establecido por Re *et al.*, 1999^[14]. El radical ABTS fue generado por interacción entre 5 mL de la solución ABTS (7 mM) y 88 μ L de la solución de persulfato de potasio (0.139 mM). La prueba se realizó agregando 245 μ L de solución de ABTS⁺ y 5 μ L de extracto de película. La absorbancia fue monitoreada a 734 nm en un iMark Bio-Rad (Japón). El porcentaje de inhibición del radical fue calculado de la siguiente manera (5).

$$PI \% = \left(\frac{Ab - Aa}{Ab} \right) \times 100 \quad (5)$$

Donde Ab es la absorbancia del blanco y Aa la absorbancia de la muestra.

Evaluación del efecto protector sobre eritrocitos humanos

La hemólisis inducida por AAPH [2,2'-azobis (2-metilpropionamidina) dihidro clorhídrico] fue determinada por el método establecido por Lu *et al.*, 2010^[15] y modificado para la utilización con extracto de membrana. Primero se colectó una muestra de sangre mediante venopunción del área antecubital en un tubo con EDTA y posteriormente la muestra fue centrifugada a 350 g por 5 minutos. Una vez centrifugada, se descartó el plasma y se recolectó el paquete eritrocitario. Los eritrocitos fueron lavados en tres ocasiones con 3 mL de solución salina al 0.9% (p/v) y centrifugados des-

pués de cada lavado a 350 g por 5 minutos. Después, se preparó una suspensión de eritrocitos al 5% con PBS (v/v). Para la prueba de protección al eritrocito se colocaron 50 μ L de eritrocitos (5%) con 50 μ L de extracto de membrana y 400 mmol de AAPH en un tubo de vidrio. Después se preparó de igual forma, una mezcla control pero sin extracto y sin membrana (hemólisis completa). Las suspensiones fueron incubadas a 37°C con agitación continua a 30 rpm en oscuridad por 3 h. Posteriormente se centrifugó a 2000 x g por 5 min y la absorbancia del sobrenadante se leyó a 540 nm en microplaca iMark Bio-Rad. Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición de hemólisis del eritrocito humano usando (6).

$$\% \text{ de inhibición de hemólisis} = \left(\frac{\text{AAPH} - \text{HM}}{\text{AAPH}} \right) \times 100 \quad (6)$$

Donde AAPH = absorbancia de la hemólisis completa y HM= absorbancia del sobrenadante.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Solubilidad (degradabilidad): La solubilidad proporciona información sobre la resistencia de las membranas al contacto con el agua. Los valores de solubilidad (Tabla 1) indicaron que la adición de RMO o TTO reducían la solubilidad de CH comparada con el control ($p < 0.05$). Las membranas de RMO-0.25% (39 %) y TTO-1.00% (67%) fueron las que mostraron menor solubilidad ($p < 0.05$) comparada con las membranas con otras concentraciones de aceites esenciales. Otros autores han reportado una reducción de solubilidad (41 a 55%) en películas de CH incorporadas con aceite de canela al 1.5% y 2.0% [16]. Ojagh et al. [17] también observaron una reducción superior al 50% en la solubilidad de películas de CH con arcilla de montmorillonita incorporadas con RMO (1.0%) y TTO (1.0%). Los resultados también mostraron que entre mayor es la concentración de aceites esenciales en la membrana CH, menor es su solubilidad. Por otro lado, la solubilidad mostrada por la membrana control podría ser relativamente normal,

porque las membranas de CH generalmente están protonadas, lo que incrementa su solubilidad al contacto con el agua [18].

TABLA 1. Valores obtenidos de grosor, solubilidad y PVA de membranas de CH con RMO o TTO.

Membrana	Grosor (mm)	Solubilidad (%)	PVA (g mm/kPa h m ²)
Control	0.086 ± 0.003	54.57 ± 0.25 ^a	1.44 ± 0.04 ^a
RMO-0.25%	0.103 ± 0.003	33.18 ± 1.35 ^b	0.98 ± 0.08 ^b
RMO-0.50%	0.104 ± 0.004	40.96 ± 1.12 ^c	0.97 ± 0.10 ^b
RMO-1.00%	0.107 ± 0.005	40.56 ± 1.30 ^c	1.03 ± 0.03 ^b
TTO-0.25%	0.088 ± 0.005	35.26 ± 0.66 ^b	0.61 ± 0.08 ^c
TTO-0.50%	0.084 ± 0.002	37.05 ± 0.44 ^d	1.02 ± 0.01 ^b
TTO-1.00%	0.079 ± 0.003	17.93 ± 1.26 ^e	1.01 ± 0.02 ^b

Medias (± DE) en una misma columna con diferentes superíndices indican diferencia (Prueba de Duncan; $p < 0.05$).

PVA: Los valores de PVA de las membranas de CH incorporadas con RMO y TTO se muestran en la Tabla 1. Se observa que la membrana de CH con baja concentración de TTO (0.25%) mostró el mejor comportamiento como barrera contra el vapor de agua comparado con las membranas con el resto de las concentraciones de aceites y el control. La membrana con TTO-0.50% y la TTO-0.25% redujeron significativamente la PVA de CH (29% y 58% respectivamente) al compararlas con la membrana control.

Sánchez-González et al. [18] desarrollaron películas de CH incorporadas con TTO (2.0%) y observaron una reducción de PVA de hasta 40%. Estos resultados difieren de nuestro estudio, ya que una concentración más baja de TTO (0.25%) confirió a la membrana una mayor reducción de la PVA. Por otro lado, la incorporación de RMO-1.00% confirió una reducción de PVA de 28% y RMO-0.25% de 32% aunque significativamente menor que las conferidas por TTO. Estos resultados mostraron que las propiedades de barrera contra la humedad son significativamente mejores a más bajas concentraciones de RMO y TTO.

Propiedades ópticas: El color medido indica la apariencia de las membranas. En la Tabla 2 se observan los valores de color mostrados por las membranas (valores de b^*).

TABLA 2. Parámetros de color de membranas de CH con RMO y TTO.

Membranas	L^*	a^*	b^*
Control	68.15 ± 1.12 ^a	-0.12±0.04 ^a	6.25±0.10 ^a
RMO-0.25%	66.45 ± 1.02 ^a	0.02±0.01 ^b	4.65±0.05 ^b
RMO-0.50%	60.04 ± 0.72 ^b	0.04±0.00 ^b	5.38±0.07 ^c
RMO-1.00%	56.09 ± 0.72 ^c	0.27±0.02 ^c	5.54±0.04 ^c
TTO-0.25%	69.22 ± 0.62 ^a	-0.09±0.04 ^a	4.46±0.07 ^b
TTO-0.50%	67.80 ± 0.67 ^a	0.11± 0.03 ^b	5.30±0.07 ^c
TTO-1.00%	65.82 ± 0.72 ^a	0.26± 0.05 ^c	5.36±0.17 ^c

Medias (± DE) en una misma columna con diferentes superíndices indican diferencia (Prueba de Duncan; $p < 0.05$).

La membrana control presentó la mayor intensidad del color amarillo, pero con la incorporación de RMO y TTO se observó una reducción significativa de la misma ($p < 0.05$). Las membranas de RMO y TTO al 0.25% mostraron un amarillo menos intenso. El incremento en la concentración de aceites en las membranas de CH no redujo la coloración amarilla.

Se ha reportado que el incremento de la cantidad de aceite esencial incorporado en películas de CH no necesariamente confiere comportamiento lineal de la coloración; incluso, la coloración observada puede atribuirse a otras propiedades del CH, como el peso molecular, grado de desacetilación y presencia de calor durante su elaboración [11, 19]. Por otro lado, observamos que la incorporación de TTO a las membranas de CH no redujo los valores de L^* (luminosidad y brillo) en comparación con el control. En cambio, la incorporación de RMO al 0.50 y al 1.00% redujo significativamente los valores de L^* . Esta variación en la luminosidad podría explicarse a la alteración molecular del CH

con RMO. En general, los valores observados de L^* fueron mayores que los reportados por otros autores que han incorporado polifenoles de té (35- 27 valores L^*) pero menores a los de películas de CH con EDTA y aceite de canela (90-89 valores de L^*) [20].

TABLA 3. Transmitancia de la luz (%) y valores de transparencia de membranas de CH incorporadas con RMO y TTO.

Membranas	Longitud de onda (nm)				
	200	280	350	400	Transparencia
Control	0.19	0.15	20.36	30.46	2.66 ± 0.012 ^a
RMO-0.25%	0.02	2.63	25.54	31.67	2.57 ± 0.006 ^b
RMO-0.50%	0.01	0.81	16.25	22.39	2.44 ± 0.020 ^c
RMO-1.00%	0.01	0.35	14.60	20.47	2.40 ± 0.006 ^c
TTO-0.25%	0.08	0.17	16.82	28.51	2.69 ± 0.008 ^a
TTO-0.50%	0.01	0.02	13.75	27.19	2.56 ± 0.010 ^d
TTO-1.00%	0.00	0.02	5.25	18.40	2.34 ± 0.003 ^c

Medias (±DE) en una misma columna con diferentes superíndices indicar diferencia (Prueba de Duncan; $p < 0.05$).

En la Tabla 3, se muestra el comportamiento de la transparencia y la transmitancia de la luz de las membranas. En general, todas las membranas fueron ligeramente opacas, pero las membranas control y aquella con TTO-0.25% mostraron la mayor transparencia.

De acuerdo a Sánchez-González *et al.*, 2010 [18] la diferencia en los niveles de transparencia de las membranas podría estar ligada a la estructura interna desarrollada durante el secado, debido a la dispersión de la fracción del volumen de los aceites esenciales y el tamaño de formación de sus gotas. Por otro lado, las membranas estudiadas fueron capaces de bloquear la transmisión de la luz ultravioleta (200 y 280 nm). Esto probablemente se deba a la compleja mezcla de compuestos de los aceites de RMO y TTO. Comportamientos similares de bloqueos de la luz ultravioleta han sido observados con membranas de gelatina de pescado y aceite esencial de orégano [21].

Actividad antioxidante (radical ABTS): La Figura 2 muestra que la membrana con RMO-0.25% presentó la mayor capacidad antioxidante (9.0%). Por otro lado, las membranas con RMO-0.50% (6.4%) y TTO-0.25% (6.0%) mostraron la actividad más baja. Las membranas control (7.5%), las incorporadas con RMO (7.2%), TTO (7.1 %)-0.50% y TTO (7.0%)- 1.00% no presentaron diferencias en su capacidad antioxidante ($p > 0.05$).

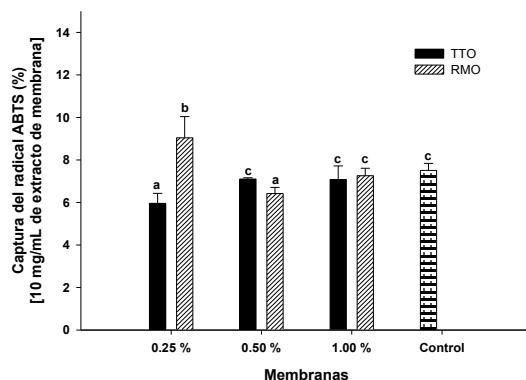


FIGURA 2. Capacidad antioxidante (radical-ABTS) de los extractos de las membranas incorporadas con TTO y RMO.
Los datos muestran los valores medios (barras para cada tipo de membranas). Literales diferentes indican diferencias ($p < 0.05$).

La capacidad antioxidante mostrada por la membrana control fue reportada y se atribuye a la reacción de los residuos del grupo amino del carbono número 2 (CH) con radicales libres [22]. No observamos cambios en la actividad antioxidante al incorporar aceites esenciales en las membranas de CH, con excepción en TTO-0.25%. Sin embargo, las capacidades antioxidantes de RMO y TTO son reconocidas, el primero debido a la presencia de tres compuestos terpénicos (α -terpineno, α -terpinoleno y γ -terpineno) y el segundo a diversos compuestos fenólicos como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, rosmadial, epirosmanol, rosmadifenol, ácido rosmarinico [16, 23].

En este estudio observamos baja actividad antioxidante. Probablemente, la matriz de CH pudo haber formado encapsulación parcial de RMO y TTO indu-

cida por el grupo carboxilato ($\text{NH}_3^+ \text{-OOCCH}$) o bien haber resultado de la interacción química de los compuestos de los aceites esenciales con la matriz de CH.

Efecto protector sobre eritrocitos humanos: Esta prueba simula el efecto del ataque del radical AAPH sobre la membrana eritrocitaria (peroxidación de fosfolípidos) y es complementaria a la actividad antioxidante medida por el radical ABTS (método químico). Esto da una mejor perspectiva del comportamiento que pudieran tener los extractos de las membranas al estar en contacto con radicales y la protección que pudiera brindar sobre la célula eritrocitaria (simulación *in vivo*), bajo el principio de que el daño de la membrana eritrocitaria acompaña eventualmente a la hemólisis y donde la liberación de hemoglobina es el indicador de daño [24]. La Figura 3 muestra que todas las membranas brindan un efecto protector al eritrocito (mayor a 63 %).

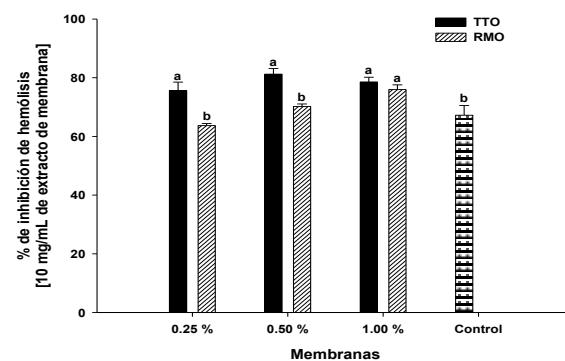


FIGURA 3. Efecto protector sobre el eritrocito humano de los extractos de las membranas incorporadas con TTO y RMO.
Los datos muestran los valores medios (barras para cada tipo de membranas). Literales diferentes indican diferencias ($p < 0.05$).

El mayor efecto protector fue mostrado por la membrana con TTO-0.50% (81 %) y el más bajo por la membrana con RMO-0.25% (63 %). Los extractos de la membranas con 0.25% y 0.50% de TTO, mostraron mejor efecto protector comparadas con aquellas incorporadas con RMO y el control ($p < 0.05$).

Es importante resaltar que el comportamiento de los resultados obtenidos por el método del radical ABTS fueron diferentes comparados con aquellos del efecto protector sobre el eritrocito humano. El método del radical ABTS mide la capacidad de las moléculas para reducir un radical libre artificial, mientras que el ensayo del efecto protector sobre el eritrocito simula las condiciones *in vivo* a través de un modelo celular. Por otro lado, la membrana control presentó buen efecto protector al eritrocito que aparentemente puede atribuirse a los grupos protonados del grupo amino en la matriz de CH. Estos grupos pudieran inducir interacciones electrostáticas con las cargas negativas de la membrana de los eritrocitos e inducir una forma de agregación celular que evita el daño de la membrana celular [25]. Aunque los componentes de RMO y TTO son conocidos como excelentes antioxidantes, en este estudio observamos que el efecto de protección al eritrocito pudiera ser inducido más por el CH que por los aceites esenciales incorporados, o bien, a la excesiva liberación de los aceites incorporados en la membrana o baja liberación de los aceites esenciales encapsulados [18].

CONCLUSIONES

La membrana de TTO-1.00% mostró la mejor reducción de solubilidad con 67%. Por otro lado, la membrana con baja concentración de TTO (0.25%) mostró el mejor comportamiento como barrera contra el vapor de agua, con una reducción de 58% en relación con la membrana control. Todas las membranas presentaron una coloración amarilla, fueron ligeramente opacas y con propiedades de bloqueo de la luz UV. Los extractos de las membranas presentaron una baja capacidad antioxidante (9%).

Por el contrario, las membranas mostraron altos porcentajes de inhibición de hemólisis eritrocitaria (>63%). Aunque se requieren estudios adicionales sobre las características fisicoquímicas, mecánicas, microestructura y antimicrobianas, consideramos que los resultados del presente estudio son un punto de inicio para que las membranas de CH incorporadas con RMO y TTO puedan ser consideradas como biomaterial de estudio con gran potencial de aplicación en el campo de la salud.

REFERENCIAS

[1] Foster LJR, Ho S, Hook J, Basuki M, Marçal H. "Chitosan as a Biomaterial: Influence of Degree of Deacetylation on Its Physiochemical, Material and Biological Properties," *Plos One*, vol. 10, no. 8, pp. e0135153, 2015. [10.1371/journal.pone.0135153](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135153)

[2] Fang L, Wolmarans B, Kang M, Jeong KC, Wright AC. "Application of Chitosan Microparticles for Reduction of Vibrio Species in Seawater and Live Oysters (*Crassostrea virginica*)," *Appl Environ Microb*, vol. 81, no. 2, pp. 640-647, 2015. [10.1128/aem.02856-14](https://doi.org/10.1128/aem.02856-14)

[3] Hernández-Lauzardo AN, Hernández-Martínez M, Velázquez-del Valle MG, Guerra-Sánchez MG, Melo-Giorgana GE. "Actividad Antifúngica del Quitosano en el Control de Rhizopus stolonifer (Ehrenb.:Fr.) Vuill. y *Mucor* spp.," *Mexican Journal of Phytopathology*, vol. 25, no. 2, pp. 109-113, 2007.

[4] Dragostin OM, Samal SK, Lupascu F, Pâncariu A, Dubruel P, Lupascu D, et al.,. "Development and Characterization of Novel Films Based on Sulfonamide-Chitosan Derivatives for Potential Wound Dressing," *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 12, pp. 29843-29855, 2015. [10.3390/ijms161226204](https://doi.org/10.3390/ijms161226204)

[5] Rašković A, Milanović I, Pavlović N, Ćebović T, Vukmirović S, Mikov M. "Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential," *BMC Complementary Altern Med*, vol. 14, no., pp. 225-225, 2014. [10.1186/1472-6882-14-225](https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-225)

[6] Carson CF, Hammer KA, Riley TV. "Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties," *Clin Microbiol Rev*, vol. 19, no. 1, pp. 50-62, 2006. [10.1128/CMR.19.1.50-62.2006](https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.50-62.2006)

[7] Del Toro-Sánchez CL, Ayala-Zavala JF, Machi L, Santacruz H, Villegas-Ochoa MA, Alvarez-Parrilla E, et al.,. "Controlled release of antifungal volatiles of thyme essential oil from β -cyclodextrin capsules," *J Incl Phenom Macro*, vol. 67, no. 3, pp. 431-441, 2010. [10.1007/s10847-009-9726-3](https://doi.org/10.1007/s10847-009-9726-3)

[8] Khanafari A, Marandi R, Sanatei S. "Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods," *J Iran Environ Health Sci Eng*, vol. 5, no. 1, pp. 19-24, 2008.

[9] Hongpattarakere T, Oraphan R. "Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)," *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, vol. 30, no. Suppl 1, pp. 1-9, 2008.

[10] López-Mata MA, Ruiz-Cruz S, Ornelas-Paz JJ, Cira-Chávez LA, Silva-Beltrán NP. «Antibacterial and antioxidant properties of edible chitosan coating incorporated with essential oils,» *Int J Pharm Bio Sci*, vol. 6, no. 4, pp. 251-264, 2015.

[11] Casariego A, Souza BWS, Cerqueira MA, Teixeira JA, Cruz L, Díaz R, et al.,. "Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations," *Food Hydrocolloid*, vol. 23, no. 7, pp. 1895-1902, 2009. [10.1016/j.foodhyd.2009.02.007](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.02.007)

[12] Guillard V, Broyart B, Bonazzi C, Guilbert S, Gontard N. "Preventing Moisture Transfer in a Composite Food Using Edible Films: Experimental and Mathematical Study," *J Food Sci*, vol. 68, no. 7, pp. 2267-2277, 2003.

[13] Han JH, Floros JD. "Casting Antimicrobial Packaging Films and Measuring Their Physical Properties and Antimicrobial Activity," *J Plast Film Sheet*, vol. 13, no. 4, pp. 287-298, 1997. [10.1177/875608799701300405](https://doi.org/10.1177/875608799701300405)

[14] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay," *Free Radical Bio Med*, vol. 26, no. 9-10, pp. 1231-1237, 1999. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)

[15] Lu J, Jin Y, Liu G, Zhu N, Gui M, Yu A, et al.,. "Flavonoids from the leaves of *Actinidia kolomikta*," *Chem Nat Compd*, vol. 46, no. 2, pp. 205-208, 2010. [10.1007/s10600-010-9569-6](https://doi.org/10.1007/s10600-010-9569-6)

[16] Abdollahi M, Rezaei M, Farzi G. "A novel active bionanocomposite film incorporating rosemary essential oil and nanoclay into chitosan," *J Food Eng*, vol. 111, no. 2, pp. 343-350, 2012. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.012](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.012)

[17] Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SMH. "Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water," *Food Chem*, vol. 122, no. 1, pp. 161-166, 2010. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033)

[18] Sánchez-González L, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. "Physical and antimicrobial properties of chitosan-tea tree essential oil composite films," *J Food Eng*, vol. 98, no. 4, pp. 443-452, 2010. [http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.026](https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.01.026)

[19] Leceta I, Guerrero P, de la Caba K. "Functional properties of chitosan-based films," *Carbohydr Polymers*, vol. 93, no. 1, pp. 339-346, 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.031](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.031)

[20] Wang L, Dong Y, Men H, Tong J, Zhou J. "Preparation and characterization of active films based on chitosan incorporated tea polyphenols," *Food Hydrocolloid*, vol. 32, no. 1, pp. 35-41, 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034](https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.11.034)

[21] Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Farahmandghavi F. "Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil," *Ind Crop Prod*, vol. 67, no., pp. 403-413, 2015.

[22] Genskowsky E, Puente LA, Pérez-Álvarez JA, Fernandez-Lopez J, Muñoz LA, Viuda-Martos M. "Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*)," *LWT-Food Sci Technol*, vol. 64, no. 2, pp. 1057-1062, 2015. [http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.026](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.026)

[23] Kim H-J, Chen F, Wu C, Wang X, Chung HY, Jin Z. "Evaluation of Antioxidant Activity of Australian Tea Tree (*Melaleuca alternifolia*) Oil and Its Components," *J Agr Food Chem*, vol. 52, no. 10, pp. 2849-2854, 2004. [10.1021/jf035377d](https://doi.org/10.1021/jf035377d)

[24] Fernandes JC, Eaton P, Nascimento H, Gião MS, Ramos ÓS, Belo L, et al.,. "Antioxidant activity of chitoooligosaccharides upon two biological systems: Erythrocytes and bacteriophages," *Carbohydr Polymers*, vol. 79, no. 4, pp. 1101-1106, 2010. [http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.050](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.050)

[25] Wang QZ, Chen XG, Li ZX, Wang S, Liu CS, Meng XH, et al.,. "Preparation and blood coagulation evaluation of chitosan microspheres," *J Mater Sci-Mater M*, vol. 19, no. 3, pp. 1371-1377, 2008.