



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.  
Posgrado en Materiales Poliméricos

**FORMULACIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA PELÍCULA DE  
DESINTEGRACIÓN ORAL CON EXTRACTO ANTIOXIDANTE  
DE PROPÓLEOS DE *APIS MELLIFERA***

**Tesis que presenta**  
IMAT. CELIA MARÍA DEL VALLE HERRERA

**En opción al título de**  
MAESTRA DE CIENCIAS  
(MATERIALES POLIMÉRICOS)

**Directores de tesis:**  
Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis  
Dr. Víctor Manuel Moo Huchin

Mérida, Yucatán, México  
Abril de 2021



## **RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Celia María Del Valle Herrera** titulado “**Formulación Y Evaluación De Una Película de Desintegración Oral con Extracto Antioxidante de Propóleos de *Apis mellifera***” fue realizado en la Unidad de Materiales, grupo de reciclado y procesamiento de Materiales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del **Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis** y codirección del **Dr. Víctor Manuel Moo Huchin**, y pertenece al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

**Atentamente**



---

**Dra. Cecilia Hernández Zepeda**  
**Directora de Docencia**

Mérida, Yucatán, México, a 12 de abril de 2021.

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Celia María Del Valle Herrera

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la beca (Número de becario: 930676) que me permitió realizar el programa de posgrado nivel maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. (CICY), por aceptarme en su programa de posgrado nivel maestría y brindarme las herramientas necesarias en mi formación para la investigación, creación e innovación.

Al Laboratorio de Materiales Compuestos y de Química Macromolecular del CICY, por la infraestructura, material de laboratorio y equipos para llevar a cabo mis actividades experimentales.

Al Tecnológico Nacional de México campus Mérida (TecNM-Mérida), por la colaboración y las facilidades prestadas de sus instalaciones.

Al Laboratorio de Desarrollo de Alimentos del TecNM-Mérida, por la infraestructura, material de laboratorio, equipos y compañeros que permitieron el desarrollo de gran parte de este trabajo.

Al Dr. Carlos Rolando Ríos Soberanis, Director de este trabajo de Tesis, por su enseñanza, atención, dirección y todo el apoyo que fue fundamental para consolidar mis esfuerzos.

Al Dr. Víctor Manuel Moo Huchin, Codirector de este trabajo de Tesis, por compartir sus conocimientos, guiarme en todo momento, por su apoyo y dedicación en mi formación académica.

Al Dr. Alex Valadez González y al Dr. Enrique Sauri Duch, por su apoyo al formar parte del comité evaluador de este trabajo.

Al personal técnico de los laboratorios en CICY, por brindarme su apoyo y experiencia en la realización de las pruebas de caracterización. En especial al MC. José Rodríguez Laviada por su apoyo en las técnicas de caracterización especializadas.

A todos los Doctores docentes del Posgrado en Materiales Poliméricos del CICY, por transmitirme sus conocimientos y ser base sólida de mi crecimiento personal, académico y profesional.

Al personal de la biblioteca y cómputo por su colaboración y amabilidad.

A mis compañeros y amigos del posgrado, por brindarme su amistad, consejos, conocimiento y apoyo tanto en lo académico como en lo personal. En orden alfabético: Francisco Alfaro, Juan Pablo Colli, Mario Bonillas, Mónica Correa, Verónica Rosiles y Xianey Pasos.

¡Muchas gracias!

## **DEDICATORIA**

A mi padre, Jesús, por acompañarme con su recuerdo en los momentos difíciles y siempre creer en este gran paso para mí. Con todo el amor que siempre te tendré, este logro te lo dedico.

A mi madre Elsi, tía Silvia y mi hermano Jesús, que han compartido mis metas y mis tropiezos, gracias por su amor y apoyo incondicional, la sabiduría brindada y por siempre ser ejemplo e inspiración de superación.

A ustedes y a quienes han sido pieza fundamental en este camino, que me han animado a seguir adelante, hecho crecer como persona y creer en mí misma para ser mejor ser humano cada día, espero se sientan orgullosos porque este logro también es suyo.

Dios, gracias por la bendición de haberme guiado con tu luz en el espacio y tiempo perfecto.

## CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	VIII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
RESUMEN .....	X
ABSTRACT .....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1. ANTECEDENTES .....	3
<b>1.1 PELÍCULAS DE DESINTEGRACIÓN ORAL (PDO)</b> .....	3
<i>1.1.1 Generalidades</i> .....	3
<i>1.1.2 Características requeridas</i> .....	4
<i>1.1.3 Caracterización de PDO</i> .....	5
<b>1.2 COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN</b> .....	7
<i>1.2.1 Ingrediente Farmacéutico Activo</i> .....	7
<i>1.2.2 Polímero Formador de Película</i> .....	8
<i>1.2.3 Plastificantes</i> .....	12
<i>1.2.4 Otros componentes</i> .....	13
<i>1.2.5 Propóleos</i> .....	14
<b>1.3 MÉTODOS DE OBTENCIÓN</b> .....	15
<i>1.3.1 Fundición de películas</i> .....	15
<i>1.3.2 Técnica de extrusión por fusión en caliente</i> .....	16
<b>1.4 DISEÑO EXPERIMENTAL CON MEZCLAS</b> .....	17
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>19</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	19
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	19
<b>CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO</b> .....	20
<b>2.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTO DE PROPÓLEOS Y SU CARACTERIZACIÓN</b> .....	20
<i>2.2.1 Extracto de propóleos de Apis mellifera</i> .....	20
<i>2.2.2 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides antioxidantes en extracto de propóleos por HPLC UV-Vis</i> .....	21

2.2.3 <i>Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales</i> .....	22
2.2.4 <i>Determinación del contenido de flavonoides totales</i> .....	22
2.2.5 <i>Evaluación de actividad antioxidante</i> .....	23
<b>2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>24</b>
2.3.1 <i>Diseño experimental y preparación de mezclas</i> .....	24
2.3.2 <i>Optimización</i> .....	26
2.3.4 <i>Elaboración de las películas con compuestos antioxidantes de propóleos</i> .....	26
<b>2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS</b> .....	<b>27</b>
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1 CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES, FLAVONOIDES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE PROPÓLEOS</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3 PRUEBAS PRELIMINARES PARA LA FORMULACIÓN DE PDO</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4 ESPECTROSCOPIA INFRARROJA POR TRANSFORMADAS DE FOURIER (FTIR)</b> .....	<b>36</b>
<b>3.5 MODELADO DE DISEÑO DE MEZCLAS</b> .....	<b>37</b>
3.5.1 <i>Efecto de los componentes sobre el contenido de CFT y propiedades mecánicas de PDO</i> .....	37
3.5.2 <i>Análisis de Varianza (ANOVA)</i> .....	39
3.5.3 <i>Diagnósticos</i> .....	41
3.5.4 <i>Gráficos modelo</i> .....	41
3.5.5 <i>Optimización</i> .....	42
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>45</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>TABLA 2.1.</b> CONCENTRACIÓN DE COMPONENTES EN LA FORMULACIÓN DE PELÍCULAS DE ACUERDO AL DISEÑO DE MEZCLAS D-OPTIMAL .....	25
<b>TABLA 3.1.</b> CONTENIDO PROMEDIO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES, FLAVONOIDES TOTALES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE EEP .....	29
<b>TABLA 3.2.</b> PRUEBAS PRELIMINARES PARA EL DESARROLLO DE UNA PDO .....	32
<b>TABLA 3.3.</b> COEFICIENTES DE REGRESIÓN DE LOS MODELOS CUADRÁTICOS PARA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y PROPIEDADES MECÁNICAS.....	38
<b>TABLA 3.4.</b> ANÁLISIS DE VARIANZA PARA COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES Y PROPIEDADES MECÁNICAS COMO VARIABLES DE REPUESTA DE LA PDO. ....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1.</b> PELÍCULA DE DESINTEGRACIÓN ORAL (PDO) .....	3
<b>FIGURA 1.2.</b> CARBOXIMETILCELULOSA: A) UNIDAD DE GLUCOPIRANOSA SUSTITUIDA CON UN GRUPO CARBOXIMETILO SÓDICO EN EL C6; B) UNIDAD REPETITIVA DE LA CARBOXIMETILCELULOSA .....	11
<b>FIGURA 1.3.</b> UNIDADES DE AZÚCAR QUE COMPONEN LA GOMA ARÁBIGA: A) ARABINOSA; B) GALACTOSA; C) RAMNOSA; D) ÁCIDO GLUCURÓNICO; E) ÁCIDO 4-O-METILGLUCURÓNICO. 12	
<b>FIGURA 2.1.</b> EXTRACTO DE PROPÓLEOS MIMIEL .....	21
<b>FIGURA 2.2.</b> DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES DEL EXTRACTO DE PROPÓLEOS POR EL MÉTODO FOLIN-CIICALTEU .....	22
<b>FIGURA 2.3.</b> DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES TOTALES DEL EXTRACTO DE PROPÓLEOS POR EL MÉTODO DE $AlCl_3$ .....	23
<b>FIGURA 2.4.</b> DECOLORACIÓN DEL RADICAL LIBRE DPPH POR EL EXTRACTO DE PROPÓLEOS....	23
<b>FIGURA 2.5.</b> DECOLORACIÓN DEL RADICAL ABTS POR EL EXTRACTO DE PROPÓLEOS.....	24
<b>FIGURA 2.6.</b> MEDIDOR DE ESPESORES MITUTOYO 547-20S .....	27
<b>FIGURA 3.1.</b> CROMATOGRAMA HPLC DE COMPUESTOS FENÓLICOS INDIVIDUALES DEL EXTRACTO DE PROPÓLEOS. 1: ÁCIDO CLOROGÉNICO, 2: EPICATEQUINA, 3: ÁCIDO 2-HIDROXICINAMICO, 4: ÁCIDO FERÚLICO, 5: QUERCETINA, 6: APIGENINA, 7: KAEMFEROL, 8: ISORHAMNETINA, 9: PINOCEMBRINA Y 10: CRISINA. ....	31

<b>FIGURA 3.2.</b> ESPECTROS FTIR DE A) ALMIDÓN PREGELATINIZADO, B) GOMA ARÁBIGA Y C) CARBOXIMETILCELULOSA .....	37
<b>FIGURA 3.3.</b> GRÁFICOS DE VALORES REALES Y PREDICHOS POR EL MODELO PARA PDO: A) COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT), B) ESFUERZO MÁXIMO, C) ELONGACIÓN Y D) MÓDULO DE YOUNG.....	41
<b>FIGURA 3.4.</b> GRÁFICOS DE CONTORNO PARA LAS VARIABLES DE RESPUESTA: A) COMPUESTOS FENÓLICOS TOTALES (CFT), B) ESFUERZO MÁXIMO, C) ELONGACIÓN Y D) MÓDULO DE YOUNG.....	42
<b>FIGURA 3.5.</b> OPTIMIZACIÓN NUMÉRICA PARA MAXIMIZAR EL CONTENIDO DE CFT Y ESFUERZO MÁXIMO DE PDO .....	43

## RESUMEN

El propóleo es un producto con alto contenido de compuestos bioactivos que tienen diversas propiedades farmacológicas; sin embargo, su principal forma de comercialización y consumo en extractos etanólicos presenta limitaciones como sabor desagradable, uso restringido para niños y personas diabéticas. En este sentido, una alternativa innovadora es el desarrollo de películas de desintegración oral (PDO) que son formas de dosificación relativamente nuevas para el suministro de compuestos activos a través de la cavidad oral, las cuales han ganado popularidad debido a su facilidad de administración, eficacia terapéutica y mayor biodisponibilidad. Por tanto, en el presente trabajo tuvo como objetivo formular y evaluar a través de un diseño experimental de mezclas una PDO a base de almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa (CMC) y goma arábiga para la liberación de antioxidantes del extracto de propóleo en la cavidad oral para promover su aplicación en la salud de pacientes con dificultades para tragar o ingerir medicamentos fácilmente e incluso que padecen enfermedades neurológicas y/o degenerativas. Se evaluaron las propiedades antioxidantes del extracto estandarizado de propóleo (EEP) en base a un contenido de sólidos totales, mediante la determinación de compuestos fenólicos totales (CFT), flavonoides totales (FT), actividad antioxidante ABTS y DPPH. La identificación de los compuestos fenólicos individuales del EEP se llevó a cabo por HPLC. Para el desarrollo de las formulaciones de las PDO y evaluar el efecto de sus componentes sobre el contenido de CFT y propiedades mecánicas se propuso un diseño experimental de mezclas D-optimal con superficies restringidas y se prepararon usando el método de casting. El diseño experimental de mezclas dio como resultado un total de 11 formulaciones a evaluar. Los resultados demuestran que el contenido de compuestos bioactivos y actividad antioxidante de EEP es muy similar a propóleos colectados en otros países. El extracto de propóleos resultó con tres ácidos hidroxicinámicos, un flavanol, tres flavonoles, una flavonona y dos flavonas. Los FTIR de los componentes de la PDO demuestran una presencia predominante de carbohidratos y proteínas, mostrando una buena interacción entre ellos. El modelo cuadrático para CFT y propiedades mecánicas de PDO fueron significativos y los valores de coeficientes de determinación tuvieron valores superiores a 0.7, demostrando un buen ajuste de los datos experimentales. Los términos lineales y cuadráticos del modelo fueron significativos en la mayoría de las variables de respuesta. Se puede concluir que se logró la optimización de una PDO resistente y con mayor contenido de CFT, utilizando un extracto comercial de propóleos, almidón pregelatinizado, CMC y goma arábiga con las siguientes condiciones de la formulación: 74.82 % de propóleos, 6.48 % de aceite esencial de mandarina y 19 % de polímero.

## **ABSTRACT**

Propolis is a product with a high content of bioactive compounds that have various pharmacological properties. However, its main form of commercialization and consumption in ethanolic extracts has limitations such as unpleasant taste, restricted use for children and diabetics. In this sense, an innovative alternative is the development of orally disintegrating films (ODF) which are relatively new dosage forms for the delivery of active compounds through the oral cavity, which have gained popularity due to their ease of administration, therapeutic efficacy and increased bioavailability. Therefore, the objective of the present work was to formulate and evaluate through an experimental design of mixtures an ODF based on pregelatinized starch, carboxymethylcellulose (CMC) and Arabic gum for the release of antioxidants from the propolis extract in the oral cavity to promote its application in the health of patients with difficulties swallowing or ingesting medicines easily and even suffering from neurological and/or degenerative diseases. The antioxidant properties of the standardized propolis extract (EEP) were evaluated based on a total solids content, by determining total phenolic content (TPC), total flavonoids (TF), antioxidant activity ABTS and DPPH. The identification of the individual phenolic compounds of the EEP was carried out by HPLC. For the development of the ODF formulations and to evaluate the effect of their components on the TPC content and mechanical properties, an experimental design of D-optimal mixtures with restricted surfaces was proposed and they were prepared using the casting method. The experimental design of mixtures resulted in a total of 11 formulations to be evaluated. The results show that the content of bioactive compounds and antioxidant activity of EEP is very similar to propolis collected in other countries. The propolis extract resulted in three hydroxycinnamic acids, one flavanol, three flavonols, one flavonone, and two flavones. The FTIRs of the ODFs components show a predominant presence of carbohydrates and proteins, showing a good interaction between them. The quadratic model for TPC and mechanical properties of the ODF were significant and the coefficient of determination values had values greater than 0.7, demonstrating a good fit of the experimental data. The linear and quadratic terms of the model were significant in most of the response variables. It can be concluded that the optimization of a resistant ODF with a higher content of TPC was achieved, using a commercial extract of propolis, pregelatinized starch, CMC and Arabic gum with the following formulation conditions: 74.82 % propolis, 6.48 % oil essential tangerine and 19 % polymer.

## INTRODUCCIÓN

En los últimos años ha existido un gran interés por el desarrollo de sistemas que permitan la liberación de compuestos activos en la cavidad oral, ya que es una región atractiva para la aplicación local y sistémica de este tipo de compuestos a través de productos como tabletas, geles, parches y las películas poliméricas que se han utilizado como formas de administración de fármacos o compuestos activos [1], [2].

Las películas de desintegración oral (PDO) son formas de dosificación relativamente nuevas para el suministro de compuestos activos a través de la cavidad oral diseñadas para desintegrarse y/o disolverse rápidamente por la saliva. La mucosa sublingual es relativamente permeable debido a la membrana delgada y las venas grandes, lo que proporciona una absorción rápida y una biodisponibilidad instantánea de los medicamentos debido al alto flujo sanguíneo [3]–[5].

Varios polímeros se han utilizado en la producción de películas que se desintegran por vía oral como el quitosano, gelatina, almidón nativo, hidroxipropilcelulosa, pululano, alginato de sodio, maltodextrinas, entre otras. Sin embargo, a menudo las mezclas de polímeros se utilizan para mejorar las propiedades de las películas tales como la hidrofiliidad, flexibilidad y solubilidad [6].

El almidón es un polímero natural con grandes ventajas al ser un recurso abundante, biodegradable, sustentable y de bajo costo, por lo que es ampliamente utilizado en las industrias farmacéuticas y alimentarias debido a que tienen propiedades de formación de películas, permitiendo su uso en el desarrollo de películas de desintegración oral.

Kathpalia *et al.*, formularon y evaluaron películas de desintegración oral (PDO) basadas en almidón modificado (25 %), pululano (2-5 %), hidroxipropilmetilcelulosa (5-15 %), polietilenglicol y plastificantes como glicerina, propilenglicol y sorbitol. El ingrediente activo cargado fue dihidrocloruro de levocetirizina. Las PDO cargadas compuestas por los polímeros seleccionados con el plastificante adecuado, mostraron una excelente capacidad de formación de película junto con una buena resistencia al plegado, tiempo de desintegración *in vitro* y liberación del fármaco [7].

Asimismo, Sanjay *et al.* [8] realizaron una investigación con el objetivo de mejorar las propiedades y la biodisponibilidad del ingrediente activo en el sitio receptor mediante la formulación y evaluación de las PDO basadas en polímeros hidrófilos como

hidroxipropilmetilcelulosa y un superdesintegrante como la pectina en varias proporciones, junto con plastificantes como glicerina y manitol cargadas con atenolol.

Las PDO tienen la ventaja de ser fáciles de manejar y transportar porque son delgadas y flexibles, y también tienen una buena aceptación por parte de personas con dificultades de tragar o ingerir medicamentos, como los niños, los ancianos o incluso pacientes cuya enfermedad dificulta la deglución [9], [10]. La capacidad de desintegrarse rápidamente en la boca es la propiedad más importante de este tipo de películas pero también se requiere otras propiedades como estructurales, térmicas y mecánicas para soportar los procedimientos de embalaje, manejo y administración, estas dependen de las formulaciones y el procesamiento para la obtención de las películas con una buena calidad que permita garantizar la seguridad del usuario y la eficacia del producto [11], [12].

Los productos naturales se han usado durante muchos años en la medicina popular y han ganado mayor prominencia debido al deseo del consumidor de reemplazar los productos sintéticos por los naturales [13]. Un producto natural con propiedades farmacológicas (anticancerígeno, antiviral, antifúngico, antimicrobiano y antiinflamatorio) que puede ser incorporado a un PDO es el propóleo. Los propóleos son una mezcla compleja de constituyentes químicos, cuya composición depende de los constituyentes del material vegetal de origen y la temporada de recolección; típicamente consiste en una resina (50 %) compuesta de flavonoides y ácidos fenólicos relacionados y considerada como la fracción polifenólica, ceras (30 %), aceite esencial (10 %), polen (5 %) y varios compuestos orgánicos (5 %) [14]. Los principales compuestos fenólicos de los propóleos son: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido benzoico, ésteres de ácido cafeico, como el CAPE (feniletil éster del ácido cafeico, por sus siglas en inglés), entre otros [15].

La preparación del extracto de propóleos se realiza mediante la maceración de propóleos crudo con alcohol etílico (70 %) durante tiempos prolongados con agitación intermitente. El extracto de propóleos principalmente se comercializa en forma de tintura alcohólica [15].

Dado a las diferentes propiedades farmacológicas de los propóleos y a la necesidad de tener un producto sin alcohol para promover su aplicación en la salud del ser humano, el presente trabajo tiene como objetivo la formular y evaluar una PDO a base de almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa (CMC) y goma arábiga (y otros posibles constituyentes menores) para la liberación de antioxidantes de propóleos en la cavidad oral.

## CAPITULO 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Películas de desintegración oral (PDO)

#### 1.1.1 Generalidades

Las películas de desintegración oral (PDO) cargadas con componentes activos (Figura 1.1) han ganado popularidad debido a la buena aceptación en pacientes pediátricos y geriátricos, especialmente aquellos con dificultades de tragar o ingerir medicamentos fácilmente e incluso que padecen enfermedades neurológicas que dificultan la deglución [4], [16].



*Figura 1.1. Película de desintegración oral (PDO)*

Las primeras apariciones del concepto de películas orales se encuentran en la literatura de patentes de la década de 1960. Sin embargo, transcurrió un tiempo para que se hicieran populares hasta que Pfizer presentó Listerine® PocketPaks en 2001 como la primera tira delgada para refrescar el aliento. Nueve años después de la primera película oral en el mercado, Zuplenz® fue aprobada en Estados Unidos como la primera película para prescripción médica, seguida de varias como se muestran en la Tabla 1.1 [4].

**Tabla 1.1.** Películas orales comercializadas internacionalmente [17]

<b>Producto</b>	<b>IFA</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Uso</b>
<b>Listerine®</b>	Menta fresca	Pfizer®	Aliento bucal
<b>Zuplenz®</b>	Ondansetrón	PharmFilm®	Antiemético
<b>Benadryl</b>	Difenhidramina	Pfizer®	Antialérgico
<b>Suppress®</b>	Mentol	InnoZen®	Supresor de la tos
<b>Triaminic</b>	Difenhidramina	Novartis	Antialérgico

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

Las PDO se pueden definir como una forma de dosificación que se compone de polímeros hidrofílicos que se desintegran rápidamente por la saliva cuando se colocan en la cavidad oral, lo que produce una rápida disolución del componente activo y un pronto efecto terapéutico [18].

Las películas se pueden absorber directamente y pueden evitar tanto el metabolismo hepático como el ambiente ácido del estómago. En consecuencia, el perfil de eficacia y seguridad del agente terapéutico y la biodisponibilidad pueden mejorarse. Esto último resulta en el uso de dosis más bajas y un mejor rendimiento clínico a través de una reducción de los efectos secundarios [19], [20].

### 1.1.2 Características requeridas

Una película de desintegración oral ideal debería ser delgada y flexible, pero estable para garantizar un proceso robusto de fabricación y embalaje, y una fácil manipulación y administración. Las películas deben ser transportables, no pegajosas y mantener una forma plana sin enrollar además de ser capaz de adherirse a la cavidad oral o lengua. Deben proporcionar un sabor aceptable y una sensación bucal agradable. El tiempo de desintegración debe ser lo más corto posible. Sin embargo, es un desafío cumplir con todos estos requisitos, debido a la relación inversa entre las propiedades mecánicas y el tiempo de desintegración, ya que para acelerar la desintegración muchas PDO son frágiles, lo que causa problemas durante la fabricación o por el contrario, son flexibles pero robustos a las fuerzas mecánicas [21]–[23].

### 1.1.3 Caracterización de PDO

#### *Desintegración y disolución*

La desintegración se refiere a que una película oral se disuelve en una pequeña cantidad de saliva, perdiendo así la cohesión y fortaleza entre los diversos elementos que la conforman. Las PDO se desarrollan para desintegrarse y disolverse rápidamente en la boca, por lo tanto, se deben realizar pruebas de desintegración y de disolución. La Farmacopea Europea especifica un tiempo de desintegración <3 min y la Administración de Alimentos y Medicamentos [24] exige un tiempo de desintegración <1 min en tabletas y liofilizados [24], [25]. Lo anterior sugiere que las PDO también deberían desintegrarse rápidamente *in vivo*. A pesar de que las técnicas utilizadas para medir el tiempo de desintegración no imitan las condiciones fisiológicas en la cavidad oral y sean inadecuadas para desintegrar las formas de dosificación en general y particularmente para las PDO son comúnmente utilizadas hasta ahora. Para las PDO se han estimado tiempos típicos de desintegración entre 5 a 30 s [26].

Se han realizado esfuerzos para simular la desintegración *in vivo*, como las mediciones de ángulo de contacto y el análisis termomecánico del comportamiento de hinchamiento de las películas [27]. Otras pruebas simples, como el método del marco deslizante y el método de la placa de Petri, se han descrito en la literatura, las cuales utilizan un pequeño volumen como medio de desintegración que se adapta al pequeño volumen de saliva que existe en la boca. El método del marco deslizante consiste en colocar una PDO en una placa de Petri, agregar una gota de agua destilada y medir el tiempo hasta que la gota forme un agujero en la película. Por otro lado en el método de la placa de Petri, las PDO se colocan en la superficie de 2 mL de agua destilada en una placa de Petri y se registra el tiempo de disolución completa [19], [28].

Mishra y Amin [29] colocaron las PDO en una malla de alambre de acero inoxidable que contenía 10 mL de agua destilada. El tiempo de desintegración se definió como el tiempo hasta que se rompe la película. En otra prueba, la desintegración se determinó en una placa de vidrio con 25 mL de agua destilada. El plato se gira cada 10 segundos y el tiempo registrado cuando la película comienza a romperse [30]. Peh y Wong [23] describieron la medida del comportamiento de hinchamiento.

La mayoría de los métodos de prueba utilizados son suficientes para discriminar entre diferentes formulaciones de películas y pueden ser útiles para el control de calidad. Sin

embargo, ninguno de ellos imita suficientemente las condiciones fisiológicas. En particular, no se simula la fuerza mecánica de la lengua que actúa sobre las películas [4].

En la mayoría de los casos, el agua destilada se utiliza como medio de desintegración, debido a que no hay saliva simulada descrita en la Farmacopea Europea. Se recomienda un buffer de fosfato con pH 6.0 para la prueba de disolución de goma de mascar medicada y, por lo tanto, fue utilizado para la prueba de disolución para PDO también por Garsuch y Breitzkreutz [19].

Si el fármaco se dispersa molecularmente en la película, el factor limitante para la disolución del fármaco es la desintegración de la película. Por lo tanto, para películas de disolución rápida se puede usar una prueba de desintegración en lugar de la prueba de disolución. Esto se recomendó para tabletas bucodispersables en las pautas de la Federación Farmacéutica Internacional (FIP) y la Academia de Ciencias Farmacéuticas Aplicadas (AAPS) para la disolución y puede transferirse a las PDO. Si las partículas de fármaco se dispersan en la película para ser tragada después de la desintegración de la película, los factores limitantes son la solubilidad y la velocidad de disolución de las partículas de fármaco [31].

#### *Espesor*

El grosor de la tira se puede medir con un medidor de tornillo micrométrico en diferentes ubicaciones estratégicas. Esto es esencial para determinar la uniformidad en el grosor de la película, ya que está directamente relacionado con la precisión de la dosis en la tira [18].

#### *Resistencia al plegado*

Se determina mediante el plegado repetido de la tira en el mismo lugar hasta que la tira se rompa. El número de veces que la película se pliega sin romperse se calcula como el valor de resistencia al plegado [32].

#### *Propiedades mecánicas*

Además de los parámetros imperativos, como el tiempo de desintegración y disolución de las PDO, las propiedades mecánicas de las películas desempeñan un papel importante en su comportamiento físico. Por lo tanto, los parámetros estudiados comúnmente en las PDO son la resistencia a la tracción, elongación a la rotura y módulo de Young [33].

### *Otros métodos de caracterización*

Existen otros métodos para la caracterización y control de calidad de PDO como la evaluación de la apariencia de las películas mediante inspección visual, microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (SEM) [34], [35]. La espectroscopia de infrarrojo cercano, espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier y la espectroscopia Raman son tecnologías adecuadas para calificar y cuantificar el ingrediente farmacéutico activo (IFA) dentro de las películas [36], [37]. También la calorimetría diferencial de barrido, el análisis termomecánico y la difracción de rayos X (DRX) se ha utilizado para investigar la cristalinidad y la temperatura de transición vítrea [21], [34], [38]–[40].

## **1.2 Componentes de la formulación**

Los componentes o excipientes utilizados en las películas orales se presentan a continuación en la Tabla 1.2 según sus categorías. Todos los excipientes utilizados en la formulación deben ser químicamente inertes y aprobados para su uso en la formulación de películas orales [30].

*Tabla 1.2. Composición de las películas orales*

<b>Componente o excipiente</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Ingrediente Farmacéutico Activo</b>	1 – 30%
<b>Polímero formador de película</b>	40 – 50%
<b>Plastificantes</b>	0 – 20%
<b>Rellenos, colorante, saborizante, edulcorante, otros.</b>	0 – 40%

### 1.2.1 Ingrediente Farmacéutico Activo

El ingrediente farmacéutico activo (IFA) puede incorporarse a las películas como partículas o molecularmente disperso/disuelto. Particularmente para los ingredientes farmacéuticos activos dispersos, el tamaño de partícula, la distribución de tamaño de partícula y polimorfismo se convierten en atributos de calidad críticos. Es bien sabido que estos factores pueden afectar la solubilidad, la velocidad de disolución y, en última instancia, la biodisponibilidad [4]. La carga máxima de fármaco depende tanto de la dosis que se requiera como de la solubilidad del ingrediente farmacéutico activo y/o su compatibilidad con los

excipientes [41]. Una carga crítica del fármaco puede resultar en recristalización o influencia excesiva en las propiedades mecánicas o de desintegración de las películas [19], [21], [42].

**Tabla 1.3. Productos comerciales con su IFA [18]**

Producto	IFA	Uso
<b>Klonopin Wafers</b>	Clonazepam (0.125 mg, 0.25 mg, 0.5 mg, 1 mg o 2 mg)	Ansiedad
<b>Theraflu®</b>	Dextrometorfano HBR (15mg)	Antigripal
<b>Orajel®</b>	Mentol/Pectina (2 mg/30 mg)	Úlcera bucal
<b>Gas-X</b>	Simeticona (62.5 mg)	Antiflatulento
<b>Chloraseptic®</b>	Benzocaina/Mentol (3 mg/3 mg)	Dolor de gangante

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

Normalmente, la carga de fármaco se limita a un máximo de 25 mg. Es por eso que sorprende que las películas de Gas-X (Novartis Consumer Health, Basilea) contengan una carga bastante alta con 62.5 mg de simeticona en comparación con otros productos comerciales como se muestra en la Tabla 1.3. Otros desafíos que pueden surgir son mal sabor debido al IFA, la estabilidad limitada resultado de las condiciones de fabricación o el contenido de agua residual.

### 1.2.2 Polímero Formador de Película

Los polímeros formadores de película son excipientes esenciales para los PDO, por lo que numerosos polímeros han sido propuestos en la literatura (Tabla 1.4). Sin embargo, la selección sigue siendo un reto, ya que aunque las películas deben disolverse lo más rápido en la cavidad bucal, las propiedades mecánicas de la película deben ser suficientes para el manejo, embalaje y almacenamiento [22].

Las propiedades del polímero dependen de su masa molecular y como regla general, los polímeros de baja masa molecular se disuelven más rápido, mientras que los que tienen una masa molecular más alta producen mejores propiedades mecánicas [4], [26], [43]. Cilurzo *et al.* [44] investigaron el impacto de la masa molecular de la maltodextrina en las propiedades de la película. Las películas hechas de maltodextrina con una masa molecular alta fueron más rígidas que las películas hechas de maltodextrina con una masa molecular más baja. Estas mostraron una mayor resistencia a la tracción, un mayor módulo elástico y un menor alargamiento a la rotura. Además, eran menos pegajosas que las películas hechas de maltodextrina con una masa molecular más baja.

**Tabla 1.4.** Revisión de la literatura sobre polímeros naturales utilizados para la preparación de PDO

Polímero	IFA	Descripción	Referencia
Pululano	Cetirizina HCL	Se utiliza como un polímero formador de película oral. Muestra un espesor satisfactorio, buenas propiedades mecánicas, buen tiempo de desintegración, distribución uniforme y uniformidad en la película.	[45]
	Pilocarpina HCL	La película fue fácil de hinchar y desintegrarse rápidamente.	[46]
Almidón	Benzocaína	Se utilizó hidroxipropil-almidón de <i>Pisum sativum</i> (Lycoat RS720) (25% p/p) para formular una película oral. Esta forma ofrecía homogeneidad de dosis con rápida disolución. Permitió la incorporación de IFA hidrófilos, hidrófobos y sensibles a la temperatura.	[47]
	Tianeptina	Se utilizó Lycoat NG73 como nuevo agente formador de película y sus diversas propiedades físico-mecánicas se compararon con HPC, HPMC, HEC y PVA. Lycoat NG73 mostró una mayor disolución, desintegración satisfactoria y propiedades físico-mecánicas deseadas.	[48]
Alginato de sodio	Carbono medicinal	Utilizado como material base de película. La adición de sorbitol o manitol en el mismo causó una mejora en la capacidad de adsorción de la película de carbón medicinal en comparación con su forma de polvo junto con suficiente resistencia y tiempo de desintegración.	[49]
Gelatina	Montelukast sódico	La película de disolución rápida de Montelukast sódico se preparó mediante el método de fundición con solvente utilizando gelatina como base de película con diferentes concentraciones de superdisintegrantes como celulosa microcristalina y crospovidona usando PEG 400 como plastificante. Se demostró que un 4% de crospovidona y un 10% de MCC con un 4% de gelatina como base de película fueron adecuados para desarrollar películas de disolución rápida de Montelukast sódico.	[50]
Maltodextrina	Piroxicam	Se usó maltodextrina con un bajo equivalente de dextrosa como material formador de película. Se obtuvo una película homogénea mediante el método de fundición y extrusión cargada una gran cantidad de polvos insolubles en agua más del 15% p/p.	[21]
	Nicotina	Se seleccionaron dos equivalentes de dextrosa diferentes, DE 6 y DE12, para evaluar el efecto del peso molecular del polímero sobre las propiedades de tracción de la película. Se demostró que al disminuir el valor de DE de la maltodextrina, mejoró la tenacidad de la película.	[44]

IFA: Ingrediente Farmacéutico Activo

### Almidón pregelatinizado

Los almidones son biopolímeros naturales biodegradables y relativamente económicos que se utilizan ampliamente en las industrias alimentaria y farmacéutica [51]. Sin embargo, los almidones nativos tienen algunas limitaciones, como la baja solubilidad en agua y la retrogradación no deseada después de la gelatinización en algunas circunstancias [52]. Para superar estos inconvenientes, son necesarias modificaciones físicas, químicas y/o enzimáticas del almidón [53].

El almidón pregelatinizado es un tipo de almidón físicamente modificado con capacidad de hinchamiento en agua fría y propiedades deseables de pegado y texturizado [54]. Es de gran utilidad en la producción de comprimidos de liberación controlada, cuenta con buena capacidad de hinchamiento en agua fría y propiedades de formación de barrera de gel [55]. Además, la capacidad de hinchamiento en agua fría y la baja temperatura de gelatinización hacen deseable el almidón pregelatinizado.

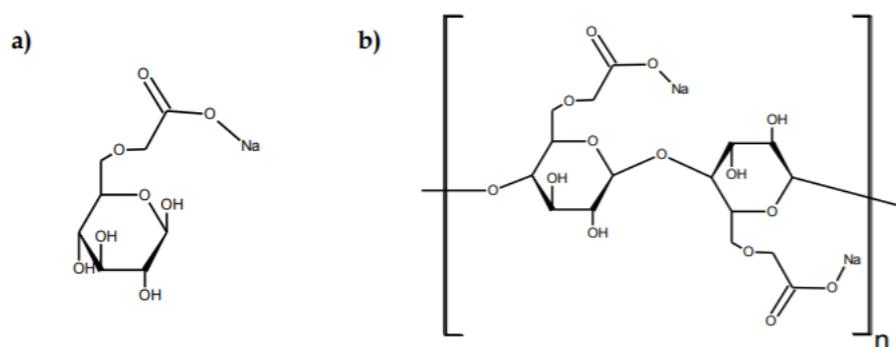
El almidón pregelatinizado es el tipo de almidón que ha sido sometido a un proceso de cocción hasta la gelatinización completa y a un proceso de secado simultáneo (o posterior) [56]. Se puede producir a través de muchos procesos físicos; sin embargo, se recomienda la cocción por extrusión por ser un método más corto y flexible en comparación con otros procesos, y se ha aplicado ampliamente a la producción de productos similares a base de cereales [57]. La cocción por extrusión convencional es un proceso continuo a alta temperatura y de corta duración, que modifica físicamente el material proteico y almidonado expansible humedecido, hace que el material se hinche mediante la combinación única de alta temperatura, presión y fuerzas de cizallamiento [58].

#### *Carboximetilcelulosa (CMC)*

La carboximetilcelulosa (CMC) es uno de los derivados de la celulosa más importantes cuyas propiedades le permiten ser utilizada en diversas aplicaciones. Físicamente es un polvo de color blanco a crema, inodoro e insípido [59]. Algunas de sus características más notorias son su alta viscosidad, su carácter higroscópico, excelente comportamiento como coloide protector y adhesivo, y buenas propiedades para formar películas. Debido a lo anterior su uso se ha extendido en diferentes industrias. Por esta razón, se produce en grandes cantidades en grado comercial crudo, sin ningún refinamiento, para emplearla en detergentes, fluidos de perforación y en la industria papelera. El refinamiento se efectúa para aplicaciones como aditivo alimenticio y farmacéutico. Su producción en gran escala es más simple que la de otros éteres de celulosa; debido a que los reactivos empleados permiten trabajar a presión atmosférica, por ser sólidos o líquidos [60].

La CMC es un polisacárido lineal, de cadena larga, soluble en agua y de carácter aniónico; ésta es obtenida mediante la sustitución de grupos hidroxilos por grupos carboximetilos, la cual se lleva a cabo por una reacción de eterificación de las unidades de glucosa [61]–[63]. En este sentido, mediante la reacción de Williamson se produce un reemplazo parcial de los grupos hidroxilos de glucosa, por el grupo  $\text{CH}_2\text{-COOH}$  o su sal sódica

CH<sub>2</sub>-COONa. La sustitución de hidroxilos es predominante en las posiciones O-2 y O-6 de las unidades de glucosa (Figura 1.2) [64]. Las propiedades físicas, químicas y biológicas de la CMC están determinadas por el peso molecular, el número medio de carboximetilos por unidad de glucosa denominado grado de sustitución (DS) y la distribución que tienen estas sustituciones a lo largo de la cadena del polímero [64]–[66].



**Figura 1.2.** Carboximetilcelulosa: a) unidad de glucopiranosica sustituida con un grupo carboximetilo sódico en el C6; b) unidad repetitiva de la carboximetilcelulosa

La presencia de grupos carboximetilo hace a la molécula de celulosa más hidrofílica, promoviendo su solubilidad en agua [64], [67]. Su higroscopicidad, junto con otras propiedades, como su poder espesante y floculante, su fácil dispersión en agua y la habilidad para formar películas sustentan su aplicación en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética, etc. [63]–[68]. Además, la carboximetilcelulosa es biocompatible y biodegradable, presenta buena compatibilidad con la piel y las membranas de mucosas, inmunogenicidad baja y no tiene efectos peligrosos sobre la salud humana [64], [66], [68]. Actualmente, se encuentra dentro de la lista de ingredientes GRAS, es aceptada como aditivo alimentario y está incluida en la guía de ingredientes inactivos por la FDA [69].

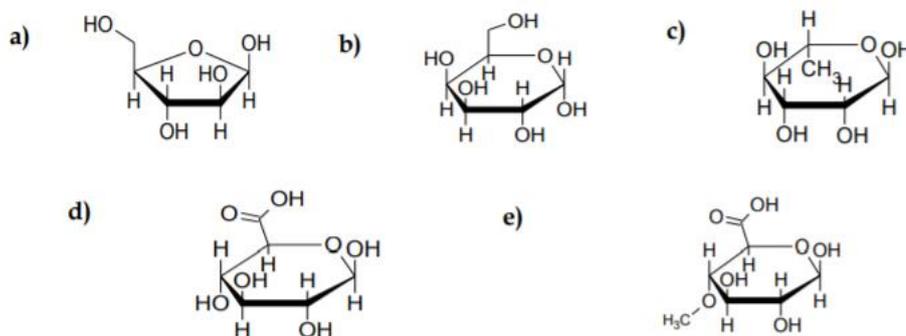
### *Goma Arábiga*

La goma arábiga es una goma natural, biocompatible y no tóxica [70]. Es un exudado proveniente de los tallos y ramas de cepas naturales de acacias [71]. Cerca del 80 % de la goma arábiga comercial se deriva de la especie *Acacia senegal* (*A. Senegal*) y la mayoría remanente de *Acacia seyal* (*A. Seyal*) [72]. Se presenta como un polvo fino de color pardo y de aroma propio característico.

La goma arábiga es un complejo altamente ramificado compuesto principalmente por polisacáridos de alto peso molecular (380 - 850 kDa), formados por arabinosa, galactosa,

ramnosa, ácido glucurónico y ácido 4-O-metilglucurónico (Figura 1.3), y por sales de calcio, magnesio y potasio. Este complejo también presenta pequeñas cantidades (alrededor del 2 % m/m) de proteínas como una parte integral de la estructura [73]. El alto nivel de ramificación que presenta la goma arábiga le confiere una baja viscosidad en soluciones concentradas, en comparación con otros hidrocoloides lineales como la goma guar [73].

Esta goma natural biodegradable se utiliza ampliamente en formulaciones farmacéuticas orales y tópicas, encontrándose catalogada en la lista de ingredientes GRAS por la FDA [74]. Asimismo, más de la mitad del suministro mundial de goma arábiga se utiliza en la elaboración de dulces para retardar la cristalización del azúcar y para espesar dulces, jarabes, glaseados y goma de mascar [75].



**Figura 1.3.** Unidades de azúcar que componen la goma arábiga: a) arabinosa; b) galactosa; c) ramnosa; d) ácido glucurónico; e) ácido 4-O-metilglucurónico.

### 1.2.3 Plastificantes

El plastificante es una sustancia normalmente líquida y de viscosidad mayor a la del agua que se adiciona a la mezcla con el fin de mejorar la flexibilidad del material mediante la reducción de esfuerzos intermoleculares [76]. Comúnmente se utilizan glicerol, propilenglicol, sorbitol, polietilenglicol de baja masa molecular, ftalatos, citratos o combinaciones. Aún después del secado las PDO tienen un contenido de agua relativamente alto que llega a actuar como plastificante [4], [43].

Se ha reportado que el plastificante es un excipiente crítico que afecta las propiedades mecánicas de las películas orales [77]. La relación entre la cantidad de plastificante y las propiedades mecánicas dependen de su naturaleza volátil y del tipo de interacción con la cadena principal del polímero. De hecho, este excipiente interactúa con los polímeros formadores de

película reduciendo su temperatura de transición vítrea y mejorando la flexibilidad del producto final. Por lo tanto, ayuda a mejorar la flexibilidad y reduce la fragilidad de la película [43], [78], [79]. Sin embargo, con el uso inadecuado pueden presentar algunas desventajas como afectar la solubilidad y la absorción del fármaco. Las altas concentraciones de plastificantes pueden causar un deterioro de la resistencia a la humedad, lo que ocasiona problemas de estabilidad o películas pegajosas [43], [44], [80].

Diferentes tipos de polímeros que se plastifican con diferentes polímeros como [81]:

- Los polímeros hidrófilos celulósicos se plastificaron fácilmente con plastificantes que contienen hidroxilo como PEG, propilenglicol, glicerol y polioles.
- Polímeros celulósicos menos hidrófilos se plastificaron con ésteres de ácido cítrico y ácido ftálico.
- Polímeros como el alcohol polivinílico se plastifica fácilmente con glicerol.
- Tanto la hidroxipropilmetilcelulosa como las películas de alcohol polivinílico se plastifican con dietilenglicol.

#### 1.2.4 Otros componentes

Otros componentes o excipientes para las PDO incluyen agentes estimulantes de saliva, saborizantes, edulcorantes y colorantes.

El agente estimulante de saliva tiene el propósito de aumentar la producción de saliva que ayuda a la desintegración más rápida de la película oral. Ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido ascórbico y ácido tartárico se han utilizado para estimular las secreciones salivales. Estos agentes pueden utilizarse solos o en combinación [82], [83].

Como agente saborizante se puede utilizar cualquier sabor que éste aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos [24] para enmascarar lo amargo de la formulación. Estos agentes pueden seleccionarse de los aceites, resinas oleosas o extractos derivados de varias partes de las plantas como hojas, frutos y flores. La cantidad a utilizar depende del tipo de sabor utilizado. Los sabores se pueden agregar son aceites esenciales como menta, hierbabuena, gaulteria, canela, clavo de olor, sabores de frutas ácidas como el limón y la naranja, o dulces como la vainilla y el chocolate. Se pueden utilizar solos o en combinación [82], [84].

Tanto los edulcorantes naturales como los sintéticos que se agregan, se utilizan para mejorar la palatabilidad de las formulaciones al disolverse en la boca [85].

Varios colorantes utilizados en estas formulaciones son colores FD&C, EU, naturales y colores personalizados combinados con Pantone. La concentración de estos dependerá del tipo de color a utilizar. Los colores aprobados por FD&C se utilizan en la concentración que no exceda del 1 % p/p en la fabricación de películas delgadas orales [85], [86].

El surfactante o tensoactivo se utiliza como solubilizante o humectante en la formulación para que la película se disuelva en pocos segundos y libere el ingrediente activo para producir un efecto terapéutico. Algunos surfactantes comúnmente usados son lauril sulfato de sodio y cloruro de benzalconio [85], [86].

### 1.2.5 Propóleos

El propóleos es un material de consistencia resinosa producido por las abejas que tiene un aspecto físico, color y consistencia muy variables, dependiendo de muchos factores como el origen geográfico, los tipos de fuentes vegetales, el momento de la recolección y la estación del año. Las abejas usan propóleos para sellar las aberturas en la colmena para evitar la entrada de intrusos, para mantener una temperatura interna constante, para contribuir al logro de un ambiente aséptico interno y, en general, para proteger a la colmena de una infección bacteriana generalizada [87]–[90].

La composición del propóleos es extremadamente compleja y variable, mostrando la presencia de cera de abeja, resina, aceites esenciales y polen. Las abejas segregan la cera, mientras que la resina y los aceites se obtienen de las plantas, generalmente se toman de las secreciones o al cortar fragmentos de tejidos vegetativos. Aunque el propóleos es una mezcla compleja, sus actividades biológicas se reportan debido a la presencia de flavonoides, ácidos fenólicos y éteres obtenidos principalmente de sustancias derivadas de las plantas (Tabla 1.5) [91].

Se conoce que la resina es la que contiene la mayoría de los compuestos que se encuentran en extractos consumidos por personas de distintos países que lo han utilizado ampliamente en la medicina popular durante muchos años, y existen pruebas sustanciales que indican que tiene propiedades antisépticas, antifúngicas, antibacterianas, antivíricas, antiinflamatorias y antioxidantes [91].

*Tabla 1.5. Ingredientes biológicamente activos en propóleos*

<b>Actividad biológica</b>	<b>Ingrediente Activo</b>
<b>Antibacterial</b>	Diferentes flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres, ácidos p-cumaricos prenilados, diterpenos de labdano
<b>Antifúngica</b>	Pinocembrina, galangina, ácido benzoico, ácido salicílico, vainillina
<b>Antiviral</b>	Polifenoles, ácidos fenilcarboxílicos y ésteres de sustituidos, ácidos cinámicos, ácido cafeico, quercetina, luteolina, fisetina, quercetagetina
<b>Antioxidante</b>	Diferentes flavonoides fenólicos y sus ésteres
<b>Inmunomoduladora</b>	CAPE, crisina, ácido cinámico, derivados del ácido cafeicoquinico, clerodano diterpenoide, artipelina C
<b>Antiinflamatoria</b>	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres, artipelina C
<b>Anticancerígena</b>	Éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE), apigenina, quercitina, genisteína, rutina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, kaempferol, naringenina

### 1.3 Métodos de obtención

Los dos principales métodos involucrados en el desarrollo de películas orales son el proceso de fundición de películas y la técnica de extrusión por fusión en caliente.

#### 1.3.1 Fundición de películas

Basado en la literatura, el método de fundición de películas es seguramente el proceso más explorado y frecuentemente utilizado para la fabricación de películas. Esto se debe principalmente a los sencillos pasos involucrados en el proceso y la configuración económica del sistema que conlleva la investigación a escala de laboratorio [33].

Todo el proceso implica al menos los siguientes pasos diferentes para desarrollar una película:

1. Preparación de la solución de polímero.
2. Eliminación de aire de la solución.
3. Transferencia de la solución al molde.
4. Secado de la solución de fundición.
5. Cortar la forma de dosificación final que contiene la cantidad requerida de fármaco.
6. Embalaje.

Algunos factores son críticos a considerar durante el proceso de elaboración. La película debe mostrar una adhesión suficiente al molde, pero debe ser removible al final del proceso [4]. Durante el secado, es importante evitar el llamado efecto de ondulación. Al entrar en contacto con el aire caliente y seco, los disolventes del proceso pueden evaporarse inmediatamente, dejando una capa delgada de polímero seco en la superficie de la película. Esto sella la solución de fundición húmeda debajo de la superficie, impidiendo una mayor evaporación. El aumento de la temperatura aumenta aún más la presión de vapor hasta que la superficie de la película se rasga. La construcción y ruptura de la superficie ocurre varias veces, lo que lleva a superficies de película dispares [43]. El punto final del secado debe controlarse cuidadosamente [18], [43]. Si se utilizan disolventes orgánicos, deben eliminarse a niveles aceptables [26]. Es necesario un contenido de agua residual para obtener películas flexibles [18]. Sin embargo, un alto contenido de agua puede conducir a películas pegajosas. En particular, si el fármaco se disolvió parcialmente en la masa de recubrimiento, el crecimiento de los cristales durante el proceso de secado y el almacenamiento pueden afectar la uniformidad del contenido [19], [42]. Las posibles variaciones del proceso básico son la colada con semisolvente o la introducción de burbujas de gas para acortar el tiempo de desintegración [30].

### 1.3.2 Técnica de extrusión por fusión en caliente

La técnica de extrusión por fusión en caliente se ha propuesto como un proceso de fabricación sin disolventes para las PDO. El ingrediente o componente activo se mezcla con excipientes en estado sólido. La mezcla se calienta y se presiona a través de una boquilla de ranura a una banda, que se enfría y se corta al tamaño de película [21], [92]. Recientemente, se introdujo otro método utilizando extrusión por fusión en caliente y matrices esféricas. La banda delgada se prepara utilizando un rodillo enfriado [93].

La extrusión seguramente tiene algunas ventajas sobre la colada con solventes, como la falta de solventes y el secado. Sin embargo, el proceso de fusión puede afectar el IFA, el sabor o la estabilidad del polímero pero el principal problema parece ser la falta de polímeros

adecuados [26], [78], [94]. Cilurzo *et al.* [21] comparó la extrusión de fusión en caliente con el fundido con solvente con maltodextrina como el polímero principal. Para obtener películas mecánicamente estables y no pegajosas mediante extrusión por fusión en caliente, se tuvo que agregar celulosa microcristalina, lo que afectó sustancialmente el tiempo de desintegración y la sensación en la boca [21]. La extrusión por fusión en caliente puede ser adecuada para la fabricación de películas o parches de liberación sostenida, pero lograr el pequeño espesor requerido y el corto tiempo de desintegración para las PDO es una tarea verdaderamente complicada con las técnicas actuales.

#### 1.4 Diseño Experimental con Mezclas

Existen muchos problemas reales y de investigación los cuales involucran productos que resultan al mezclar diferentes ingredientes o componentes. En estos diseños las variables de respuesta dependen de las proporciones con las que participan los ingredientes en la mezcla y no de la cantidad absoluta [95].

Un experimento con mezclas presenta algunos objetivos como:

- Determinar cuáles de los ingredientes de la mezcla o interacciones entre ellos tienen mayor influencia sobre uno o varias respuestas de interés.
- Modelar las respuestas de interés en función de las proporciones de los componentes de la mezcla.
- Usar dichos modelos para determinar en qué porcentaje debe participar cada uno de los ingredientes para lograr que la fórmula tenga las propiedades deseadas.

Al planear un experimento con mezclas se decide aplicar una metodología de planeación y análisis que asegure obtener conocimiento y soluciones.

En general, en un problema de experimentos con mezclas se tendrán  $q$  componentes o ingredientes y cada tratamiento en el experimento consiste en una combinación particular o mezcla de dichos componentes. Si se denotan por  $x_1, x_2, \dots, x_q$ , las proporciones en las que participan los componentes de la mezcla deben satisfacer dos restricciones:

$$0 \leq x_i \leq 1, \text{ para cada componente } i$$
$$\sum_{i=1}^q x_i = x_1 + x_2 + \dots + x_q = 1$$

La primera indica que las proporciones tienen que ser cantidades entre cero y uno, y la segunda condiciona a que las  $q$  proporciones sumen siempre la unidad, lo cual causa que los niveles de los componentes  $x_i$  no sean independientes entre sí. De aquí que los diseños de experimentos con mezclas sean diferentes de los diseños de experimentos factoriales y de los diseños de superficie de respuesta usuales [95].

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Formular y evaluar una PDO a base de almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa (CMC) y goma arábiga para la liberación de antioxidantes de propóleos en la cavidad oral.

### Objetivos específicos

- Caracterizar el extracto alcohólico de propóleos de *Apis mellifera* a través del contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales, compuestos fenólicos individuales por HPLC y actividad antioxidante.
- Contrastar el efecto de los componentes de la formulación de PDO sobre el contenido de compuestos fenólicos totales y propiedades mecánicas.
- Optimizar una formulación para la obtención de PDO con mayor contenido de compuestos fenólicos totales y mejores propiedades mecánicas utilizando un diseño experimental de mezclas.

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Estrategia general de trabajo

El estudio se planteó en tres etapas experimentales; la primera etapa corresponde a la caracterización del extracto comercial de propóleos Mimiél de *Apis mellifera*, evaluando su contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y sus propiedades antioxidantes; además, identificar los principales compuestos fenólicos individuales por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Esta información permite conocer la composición de antioxidantes del propóleos para su posterior uso en la formulación de PDO.

En la segunda etapa se contrastó el efecto de los componentes (tipo de matriz polimérica, contenido de extracto de propóleos y saborizante) de la formulación de PDO sobre el contenido de compuestos fenólicos totales y propiedades mecánicas.

Finalmente en la tercera etapa, con la información que se obtuvo a lo largo del desarrollo experimental se optimizó la formulación de una película de desintegración oral (PDO) a fin de proporcionar mayor contenido de compuestos fenólicos totales y mejores propiedades mecánicas utilizando un diseño experimental de mezclas. Esta etapa también permitió aportar información relevante respecto a las posibles formas de manejo y almacenamiento de PDO.

### 2.2 Obtención de extracto de propóleos y su caracterización

#### 2.2.1 Extracto de propóleos de *Apis mellifera*

El extracto comercial de propóleos (31 % de sólidos totales) de *Apis mellifera* se adquirió en la empresa Mimiél: Integradora Agroindustrial Mira S.A. de C.V. (Figura 2.1) en Mérida, Yucatán.



*Figura 2.1. Extracto de propóleos Mimiel*

Para la formulación de PDO, una alícuota del extracto comercial de propóleos (31 mL) fue diluida 8 veces con etanol al 70 % para obtener un extracto estandarizado (EEP) con 38.44 mg de sólidos/mL de propóleos. La preparación de EEP responde a que el uso directo del extracto comercial en la formulación de PDO dio lugar a una solución filmogénica poco homogénea y una película totalmente pegajosa con dificultad de manejo. El EEP se almacenó a 4°C en frasco de vidrio bajo condiciones de obscuridad hasta su análisis.

#### 2.2.2 Identificación de ácidos fenólicos y flavonoides antioxidantes en extracto de propóleos por HPLC UV-Vis

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos individuales se realizó con el sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.), equipado con un inyector manual (50  $\mu$ L) y un detector UV-vis. El instrumento es controlado por el paquete de software Chromeleon CDS (Thermo Scientific). La separación cromatográfica se realizó en una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm x 250 mm, tamaño de partícula 5  $\mu$ m) a una temperatura de 25 °C, longitud de onda de detección de 280 nm y sistema de disolvente a un flujo constante de 0.5 mL/min. La fase móvil fue agua destilada con ácido fórmico al 1 % (solvente A) y acetonitrilo grado HPLC (solvente B). Cada fase móvil se filtró bajo condiciones de vacío utilizando filtros de membrana de 0.45  $\mu$ m. El perfil de gradiente usada en la separación cromatográfica fue lineal de 2 a 100 % de la fase móvil B de 0 a 70 min.

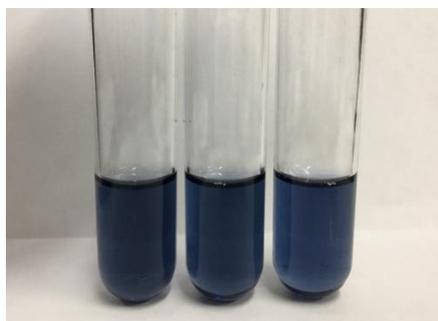
Respecto a la muestra, una alícuota de EEP (5 mL) fue evaporado a 40 °C durante 24 h para obtener los sólidos secos. Posteriormente, se resuspendido en 1.5 mL de metanol grado HPLC y diluido 1:200 con metanol grado HPLC para su inyección al sistema HPLC (50  $\mu$ L).

Los compuestos fenólicos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención y de sus espectros de absorción con estándares auténticos (Sigma Aldrich).

### 2.2.3 Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales

La concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría por el método de Folin-Ciocalteu que se fundamenta en su carácter reductor (Figura 2.2). Se utilizó como reactivo una mezcla de ácido fosfowolfrámico y fosfomolibdúico en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de wolframio ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia de color azul desarrollada se midió a 765 nm y los resultados se expresaron en mg equivalentes de ácido gálico EAG/g de extracto seco [96].

El contenido de fenoles solubles totales fue determinado siguiendo la metodología de Singleton y Rossi [97]. 50  $\mu$ L de EEP (dilución 1:10 con etanol absoluto) se mezclaron con 3 mL de agua destilada y 250  $\mu$ L del reactivo Folin-Ciocalteu (1N). Después de 5 min, se añadieron 750  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  al 20 % y 950  $\mu$ L de  $H_2O$ ; se dejaron en incubación por 30 min en ausencia de luz. Las absorbancias fueron medidas a 765 nm en un espectrofotómetro UV/Vis Cary 60 (Agilent Technologies). Se preparó una curva de calibración con diferentes concentraciones de ácido gálico y el resultado fue calculado considerando el peso de extracto seco, el volumen de extracto, y la concentración obtenida de la curva estándar.

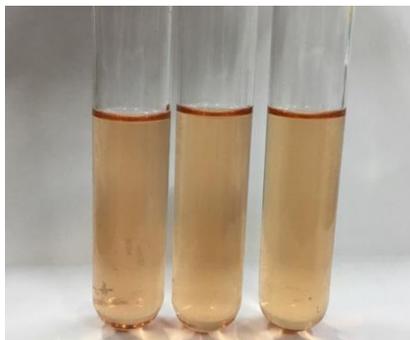


**Figura 2.2.** Determinación del contenido de compuestos fenólicos totales del extracto de propóleos por el método Folin-Ciocalteu

### 2.2.4 Determinación del contenido de flavonoides totales

El contenido de flavonoides totales (Figura 2.3) se determinó en base al método descrito por González-Aguilar *et al.* [98]. Un mililitro de EEP (diluido 1:10 con etanol absoluto) se mezcló con 4 mL de agua destilada y 300  $\mu$ L de nitrito de sodio  $NaNO_2$  (5 % v/v,  $H_2O$ ) dejando reposar por 5 min. Posterior al tiempo de equilibrio, 300  $\mu$ L de la disolución de cloruro de aluminio  $AlCl_3$  (10 % v/v, metanol) se adicionaron a la mezcla. Después de 1 min, se agregaron 2 mL de hidróxido de sodio  $NaOH$  (1M) más 2.4 mL de agua destilada, la mezcla se homogenizó y se midió la absorbancia fue medida a 415 nm con un espectrofotómetro UV-Vis

Cary 60 (Agilent Technologies). La concentración de flavonoides totales se expresó como mg equivalentes de quercetina (EQ)/g extracto seco, utilizando una curva de calibración con diferentes concentraciones de quercetina de 25-1000 ppm. El resultado fue calculado considerando el peso de extracto seco, el volumen de extracto, y la concentración obtenida de la curva estándar.



*Figura 2.3. Determinación del contenido de flavonoides totales del extracto de propóleos por el método de  $AlCl_3$*

## 2.2.5 Evaluación de actividad antioxidante

### 2.2.5.1 Ensayo DPPH

Para el ensayo DPPH (Figura 2.4), el EEP (100  $\mu$ L) (se utilizó metanol absoluto como blanco) se dejó reaccionar con 3900  $\mu$ L de DPPH (ajustado con metanol a una absorbancia igual a 0.7) en una solución de metanol. La disminución en la absorbancia se midió a 515 nm a intervalos de 1 min los primeros 10 min, y luego a intervalos de 5 min hasta la estabilización mediante un espectrofotómetro UV/Vis Cary 60 (Agilent Technologies). Los resultados se expresaron como mM Trolox/g extracto seco [99].



*Figura 2.4. Decoloración del radical libre DPPH por el extracto de propóleos*

### 2.2.5.2 Ensayo ABTS

Las mediciones se llevaron a cabo de acuerdo al protocolo publicado por Moo-Huchin *et al.* [100]. El catión  $ABTS^{•+}$  se generó a través de la interacción de 19.2 mg de ABTS disuelto en 5 ml de agua destilada y 88  $\mu$ L de 0.0378 g/mL de persulfato de potasio ( $K_2S_2O_8$ ). El catión se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 h. Después de la adición de 30  $\mu$ L de extracto de propóleos a 2970  $\mu$ L de solución ABTS diluida con etanol (ajustando a un valor de absorbancia igual a 1). La disminución de la absorbancia (Figura 2.5) se midió después de 115 min a 734 nm utilizando un espectrofotómetro UV/Vis Cary 60 (Agilent Technologies). La curva de calibración se preparó utilizando Trolox como patrón, y los resultados se expresaron como equivalentes de mM Trolox/g de extracto seco.



*Figura 2.5. Decoloración del radical ABTS por el extracto de propóleos*

## 2.3 Diseño experimental

### 2.3.1 Diseño experimental y preparación de mezclas

Para determinar una formulación óptima que incluye tres componentes para el desarrollo de PDO con ciertas características, se utilizó un diseño de mezclas con superficies restringidas, ya que no es posible producir PDO con, por ejemplo, 100 % glicerol. Cuando ocurren estas limitaciones experimentales, es necesario ajustar el diseño de la mezcla, reduciendo la escala original, pero asegurando que se obedezca la distribución correcta de los experimentos. Lo anterior se puede hacer a través de los pseudocomponentes, que son combinaciones de los componentes originales, utilizados para restablecer las coordenadas de las mezclas en relación con el espacio experimental para ser efectivamente estudiado [101]. Las restricciones en los niveles inferior y superior de cada uno de los componentes se definieron a partir de pruebas preliminares (Tabla 3.2 en el apartado de resultados). La concentración en valores reales y como pseudocomponentes de cada componente de las diferentes formulaciones se muestra en la Tabla

2.1. Los componentes de las mezclas (variables independientes) fueron el polímero (matriz polimérica de almidón pregelatinizado, goma arábica y CMC), componente activo (extracto de propóleos, 31 % de sólidos totales) y saborizante (aceite esencial de mandarina). Las variables de respuesta (variables dependientes): tiempo de desintegración, propiedades mecánicas y contenido de compuestos fenólicos totales se analizaron con el software Design-Expert® 7.0.0. y se seleccionó un diseño de mezclas D-optimal, el cual tiene el potencial de servir como una herramienta para ahorrar tiempo y recursos para el desarrollo de sistemas de administración de medicamentos [102], [103]. Se utilizó un modelo cuadrático (ecuación 1) porque se ajusta mejor a los resultados.

$$y = \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $y$  es la variable dependiente,  $\beta$  es el coeficiente de regresión para cada componente,  $x_1$  es el extracto de propóleos,  $x_2$  es el aceite esencial de mandarina y  $x_3$  es el polímero.

Los pseudocomponentes se calcularon usando la ecuación 2

$$Ps_x = (C_x - a_y)/(1 - \sum a_y) \quad \text{Ec. 2}$$

donde  $Ps_x$  es el pseudocomponente de cada componente,  $C_x$  es la concentración real del componente,  $a_y$  es el límite inferior del componente real y  $\sum a_y$  es la suma de los límites inferiores de los tres componentes en el diseño de la mezcla. Finalmente, se obtuvo un total de 11 formulaciones, incluyendo tres réplicas del punto central. Las corridas experimentales se aleatorizaron para minimizar el efecto de la variabilidad no esperada en las respuestas observadas.

**Tabla 2.1.** Concentración de componentes en la formulación de películas de acuerdo al diseño de mezclas D-optimal

Formulaciones	Componentes en la mezcla para PDO					
	Concentraciones reales			Pseudocomponentes <sup>a</sup>		
	Propóleos (%)	Aceite esencial (%)	Polímero (%)	Propóleos ( $x_1$ )	Aceite esencial ( $x_2$ )	Polímero ( $x_3$ )
1	75.10	6.20	19.00	0.907	0.093	0.000
2	70.64	4.80	24.86	0.609	0.000	0.391
3 <sup>b</sup>	69.00	6.30	25.00	0.500	0.100	0.400
4	73.50	7.80	19.00	0.800	0.200	0.000
5	68.81	6.50	24.99	0.487	0.114	0.399
6	62.40	6.90	31.00	0.060	0.140	0.800
7	61.58	7.80	30.92	0.005	0.200	0.795

8 <sup>b</sup>	69.00	6.30	25.00	0.500	0.100	0.400
9 <sup>b</sup>	69.00	6.30	25.00	0.500	0.100	0.400
10	76.50	4.80	19.00	1.000	0.000	0.000
11	64.50	4.80	31.00	0.200	0.000	0.800
Control	0	0	100	-	-	-

*a = Calculado en base a las siguientes ecuaciones:  $x_1 = (C_{propóleos} - 61)/15$ ,  $x_2 = (C_{aceite\ esencial} - 4.8)/15$ ,  $x_3 = (C_{polímero} - 19)/15$ .*

*b = Réplicas del punto central.*

### 2.3.2 Optimización

Los niveles óptimos de los componentes (propóleos, aceite esencial y polímero) se obtuvieron mediante modelos predictivos y a través de gráficos superpuestos. Tras la selección de la formulación óptima se obtuvo los valores predichos de las variables dependientes con las ecuaciones de predicción derivadas por la metodología de superficie de respuesta. Una vez obtenidos los modelos matemáticos, se utilizó la optimización numérica de respuesta múltiple a través del enfoque de función de deseabilidad propuesta por Derringer y Suich (1980) para maximizar simultáneamente el esfuerzo máximo y el contenido CFT, manteniendo las variables independientes en el rango. En la optimización, ambas respuestas se transforman en una función de deseabilidad individual adimensional, que va de 0 a 1, en donde, 0 corresponde al nivel de deseabilidad más bajo, y 1 a la condición más deseable. Para ambas variables de respuesta, se consideró el mismo nivel de importancia.

### 2.3.3 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como valor promedio  $\pm$  desviación estándar. Se realizaron los análisis de regresión y ANOVA (realizado con un nivel de confianza del 95 %) para ajustar el modelo matemático y analizar la significancia estadística de la ecuación del modelo. Se utilizó el software Design-Expert 7.0 para el plan experimental, análisis de datos, generación de modelos, determinación de condiciones óptimas y gráficos de superficie de respuesta.

### 2.3.4 Elaboración de las películas con compuestos antioxidantes de propóleos

La obtención de las PDO con compuestos antioxidantes del extracto del propóleos se realizó según la técnica de fundición. El almidón pregelatinizado, la goma arábiga y la carboximetilcelulosa se colocaron en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada bajo agitación constante (600 rpm) por 50 min a 60 °C. La temperatura de la mezcla se incrementó

a 85 °C y entonces, se agregó el glicerol bajo agitación constante a 600 rpm por 30 min. Posteriormente, se agregó el extracto de propóleos y el aceite esencial sin suspender la agitación. Se depositaron 25 g de la solución filmogénica en cada uno de los moldes de teflón de 5 cm de radio para su secado a 45 °C en una estufa (Felisa FE-133AD) durante 18 h. Las PDO se acondicionaron en un desecador a 65 % HR con nitrato de magnesio a 25 °C.

## 2.4 Técnicas analíticas

### 2.4.1 Espesor

El espesor de PDO se midió utilizando un tornillo micrométrico digital marca Mitutoyo 547 – 320S (Figura 2.6) en cinco posiciones aleatorias y calculando su promedio.



*Figura 2.6. Medidor de espesores Mitutoyo 547-20S*

### 2.4.2 Espectroscopia Infrarrojo por Transformada de Fourier (FTIR)

Se empleó un equipo de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) marca Nicolet 8700, con un rango de espectro de 4000 – 400 cm<sup>-1</sup>. El análisis se realizó a 100 barridos y una resolución de 4 cm<sup>-1</sup>. Para el análisis de PDO, se empleó un microscopio Inspect IR Plus provisto del accesorio para reflectancia total atenuada [104].

### 2.4.3 Caracterización mecánica (ensayo de tensión)

Las propiedades mecánicas se determinaron usando probetas de acuerdo a las especificaciones de la norma ASTM D638-V. Los ensayos se realizarán después de 30 días de acondicionamiento a humedad relativa del 50±2 % manteniendo temperatura constante de 25 °C. Las pruebas se llevaron a cabo mediante un ensayo de tensión uniaxial usando una máquina de pruebas universales, modelo Mini-Shimadzu AG-I equipado con una celda de carga de 1000 N. La velocidad de desplazamiento del cabezal fue de 5 mm/min.

## CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante

El contenido de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante del extracto de propóleos se muestra en la Tabla 3.1. Acorde a la literatura, se ha demostrado que las propiedades farmacológicas del propóleos se deben a su contenido de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides. Además, el contenido de estos metabolitos en propóleos son un parámetro importante que establece tanto la calidad como su potencial biológico, en especial para la actividad antioxidante [116].

El contenido promedio de CFT y FT en extracto de propóleos resultó en  $318.15 \pm 5.76$  mg EAG/g extracto seco y  $644.82 \pm 6.41$  mg EQ/g extracto seco, respectivamente. El hecho que el valor FT sea mayor al valor CFT, se puede atribuir a que el método para determinar el contenido de FT no es selectivo; las flavonas y los flavonoles, desde el punto de vista reactivo, forman complejos estables con el  $AlCl_3$  y son susceptibles de analizar mediante espectroscopia UV-Vis, por lo tanto, el extracto de propóleos de este estudio al contener dichos compuestos fenólicos (Figura 10) tiende a potenciar la reacción y el color [117]. Comparando los resultados obtenidos con la literatura, el contenido de compuestos fenólicos totales es similar a lo reportado por Bonvehí y Gutiérrez [116] oscilando entre 200 y 340 mg EAG/g de propóleos extracto seco recolectados en País Vasco (noroeste de España), mientras que el contenido de flavonoides varió entre 72 y 161 mg/g de propóleos extracto seco. En otro estudio, Ozdal *et al.* [118] encontraron que el contenido de fenoles solubles totales que osciló entre 27.48 y 199.70 mg EAG/g de extracto de propóleos fue similar al contenido de flavonoides que resultó entre 30.73 y 291.75 mg EQ/g de extracto de propóleos para muestras provenientes de 5 regiones diferentes de Turquía. Las diferencias entre los valores encontrados en este trabajo y los reportados en la literatura con respecto al extracto de propóleos se pueden atribuir al tipo de abeja, condiciones ambientales, orígenes geográficos, el porcentaje de etanol utilizado en la preparación de la tintura/extracto, diversidad de la flora del área ecológica, los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas, factores climatológicos, entre otros.

Los métodos ampliamente utilizados para evaluar la actividad antioxidante del propóleos son el DPPH y ABTS, en donde la pérdida del color de estas sustancias cromógenas de naturaleza radical ocurre de forma proporcional a la concentración de los antioxidantes donadores de hidrógenos. Los resultados de la actividad antioxidante de DPPH y ABTS para el

EEP fue de  $51.84 \pm 0.65$  mM Trolox/g extracto seco y  $271.90 \pm 12.75$  mM Trolox/g extracto seco, respectivamente. Lo anterior mostró que la actividad antioxidante del extracto de propóleos fue mayor para ABTS que para el ensayo DPPH, este fenómeno puede explicarse de diferentes maneras: 1) se sabe que el ensayo ABTS es menos selectivo que el ensayo DPPH al reaccionar con donantes de átomos de hidrogeno porque se reduce por grupos aromáticos OH- (a diferencia de DPPH) que no contribuyen significativamente a la actividad antioxidante; 2) los compuestos fenólicos reaccionan de manera diferente con los radicales libres en la fase acuosa (ensayo ABTS) y la fase orgánica (DPPH); 3) las moléculas pequeñas pueden acceder mejor al centro activo de los radicales ABTS y 4) los radicales ABTS son más reactivos que los radicales DPPH. Los resultados obtenidos en este estudio son superiores a lo reportado por Kalogeropoulos *et al.* [119] para extractos de propóleos originarios de Grecia y Chipre que osciló entre 0.33 y 1.11 mM Trolox/g EEP para DPPH. Por otro lado, Yuan *et al.* [120] encontraron en extractos de propóleos originarios de Jiangxi, China que varió de 0.18 a 1.48 mM Trolox/g de extracto seco para DPPH y de 0.25 a 2.19 mMol Tolox/g de extracto seco.

Las diferencias en la actividad antioxidante entre el EEP evaluado y lo encontrado en la literatura pueden atribuirse a diversos factores tales como, la alta variación del contenido de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales, la influencia del origen botánico de las resinas y bálsamos, el método de obtención del propóleos crudo para preparar los extractos, estación del año, entre los más importantes [121].

**Tabla 3.1.** Contenido promedio de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante de EEP

Muestra	Compuestos fenólicos totales (mg EAG/g extracto seco)	Flavonoides totales (mg EQ/g extracto seco)	DPPH (mM Trolox/g extracto seco)	ABTS (mM Trolox/g extracto seco)
Extracto etanólico de propóleos <i>Apis mellifera</i>	$318.15 \pm 5.76$	$644.82 \pm 6.41$	$51.84 \pm 0.65$	$271.90 \pm 12.75$

Los valores son expresados como promedio  $\pm$  desviación estándar

EAG = Equivalente al ácido gálico

EQ = Equivalente a quercetina

### 3.2 Identificación de compuestos fenólicos individuales del extracto alcohólico de propóleos

En este estudio se reportaron 10 compuestos fenólicos en el extracto de propóleos (Figura 3.1) de los cuales tres son ácidos hidroxicinámicos (clorogénico, ferúlico y 2-hidroxicinámico), un flavanol (epicatequina), tres flavonoles (kaempferol, quercetina e isorhamnetina), una flavonona (pinocembrina) y dos flavonas (apigenina y crisina).

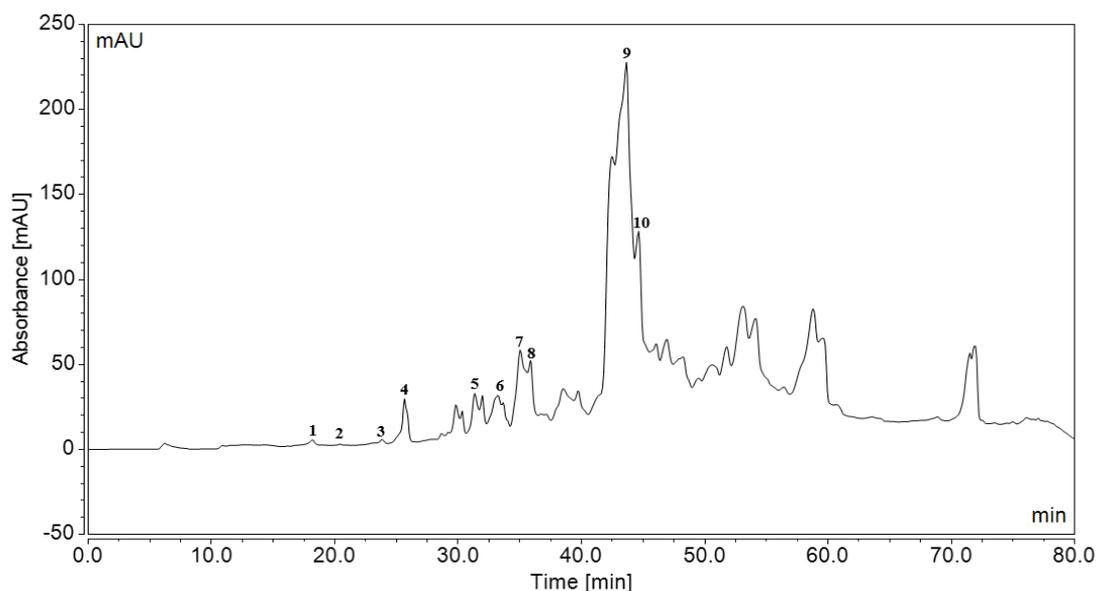
En investigaciones realizadas por Sahinler y Kaftanoglu; Farooqui y Farooqui; y Aliyazicioglu *et al.*, han confirmado las diversas propiedades terapéuticas de los flavonoides y ácidos fenólicos, cuyos compuestos fueron encontrados en el extracto de propóleos analizado [105]–[107].

El propóleos se caracteriza por una composición química compleja y diversificada, según la fuente de planta en donde las abejas recolectan las resinas y además, de otros factores ambientales. Se asume que la actividad biológica del propóleos es el resultado de la sinergia de sus componentes bioactivos. Entre los diversos componentes del propóleos, el papel más importante se atribuye a los compuestos fenólicos, en particular a los ácidos fenólicos y sus esterres[108]. Kedzia *et tal.* [109], reportaron que en extractos etanólicos obtenidos de propóleos polacos se han identificado derivados de los ácidos tanto hidroxibenzoico como hidroxicinámico y entre ellos se encontraron los ácidos protocatéquico, gentísico, p-cumárico, ferúlico y cafeico, similares a este estudio. Según lo reportado por Kolankaya *et al.* [110], la galangina es un flavonoide predominante en el propóleos turco. Por otro lado, Ahn *et al.* y Gregoris *et al.*, identificaron la presencia de crisina en baja y alta concentración en propóleos chino e italiano, respectivamente [111], [112].

Los extractos etanólicos de propóleos contienen principalmente flavonoides agliconas de flavonas, flavonoles, flavononas y chalconas. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos etanólicos de propóleos afectan, entre otros, la inhibición de la formación de especies reactivas de oxígeno, reduciendo o complejando iones de metales de transición, capturando los radicales amino superóxido y radicales peroxi; y rompen las reacciones de radicales libres impidiendo la peroxidación lipídica [108].

El efecto antibacteriano de los flavonoides se da inhibiendo la síntesis de ADN o ARN en las bacterias, su actividad antiinflamatoria al inhibir la síntesis de óxido nítrico,

glucoxigenasa, lipoxigenasa, proteínas quinasas y prostaglandina. Además, se ha demostrado que los flavonoides tienen un efecto inhibitorio en algunos virus como del herpes [113]–[115].



**Figura 3.1.** Cromatograma HPLC de compuestos fenólicos individuales del extracto de propóleos. 1: Ácido clorogénico, 2: Epicatequina, 3: Ácido 2-hidroxicinámico, 4: Ácido ferúlico, 5: Quercetina, 6: Apigenina, 7: Kaempferol, 8: Isorhamnetina, 9: Pinocembrina y 10: Crisina.

### 3.3 Pruebas preliminares para la formulación de PDO

Previo a la optimización de una formulación para obtener PDO, se realizó una investigación preliminar. En la Tabla 3.2, se presentan los resultados de las pruebas preliminares utilizando diferentes componentes para la obtención de PDO, con el propósito de seleccionar materiales como el polímero y el plastificante, así como para determinar sus restricciones en los niveles inferior y superior en el diseño experimental y preparación de mezclas. El tipo de componente y su concentración en la formulación fue acorde a lo reportado en la literatura. Los polímeros que se probaron en un principio fueron almidón de maíz, goma xantana, goma arábiga, carboximetilcelulosa (CMC) y almidón soluble; como plastificante el glicerol. Las concentraciones se ajustaron a los porcentajes reportados para este tipo de películas (Tabla 1.2). Debido a las características indeseables que presentaron las PDO como elevada pegajosidad, mala desintegración en la boca, dificultad para ser despegadas del molde, pobre estabilidad y fragilidad, se decidió eliminar a la goma xantana y al almidón soluble de la composición de la PDO. Posteriormente, se seleccionó la película P16 con una composición de 1 g de almidón pregelatinizado, 0.5 g de CMC, 0.5 g de goma arábiga y 0.48 mL de glicerol, debido a sus características deseables como una facilidad para despegarse del molde, no

romperse durante el secado, ser delgada, contar con buena elasticidad, no ser pegajosa, tener un buen tiempo de desintegración en la boca y buena estabilidad.

Tanto el almidón pregelatinizado como la goma arábica y la CMC tienen varias características en común; son polisacáridos lo cual por naturaleza los hace compatibles, son biodegradables, solubles en agua, son de bajo costo, presentan buenas propiedades para formar películas y han sido utilizados como agentes encapsulantes; y en combinación se han empleado para proteger de la oxidación a diversos compuestos bioactivos [122], lo cual representa una ventaja en este estudio al cargar la matriz polimérica con compuestos activos del propóleo. Además, son ampliamente utilizados en formulaciones farmacéuticas orales y tópicas, encontrándose catalogados en la lista de ingredientes GRAS por la FDA [69], [74].

**Tabla 3.2. Pruebas preliminares para el desarrollo de una PDO**

<b>Preliminares</b>	<b>Composición</b>	<b>Características</b>	<b>Observaciones</b>
P1	2 g de almidón pregelatinizado 0.05 g de goma xantana 0.48 ml de glicerina	-Facilidad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Uniformes y lisas al tacto -Delgadas	A pesar de que las películas P1 se desintegraban bien en la boca después de varios días de almacenamiento en condiciones controladas, se volvían más rígidas, dejaban residuos en la boca y no se desintegraban adecuadamente con las técnicas de desintegración ensayadas. Posteriormente, se hicieron películas cambiando las concentraciones al 1% y 1.5% (almidón) sin cambios significativos. Se planteó cambiar la goma xantana por goma arábica.
P2	4 g de almidón pregelatinizado 0.05 g de goma xantana 0.96 ml de glicerina	-Facilidad para despegar del molde -Se rompen durante el secado en estufa -Presenta algunos grumos	
P3	6 g de almidón pregelatinizado 0.05 g de goma xantana 1.44 ml de glicerina	-Facilidad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Gruesas y con grumos	
P4	2 g de almidón pregelatinizado 2 g de goma arábica 0.96 ml de glicerina	-Dificultad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Buena desintegración en la boca Muy pegajosa -Pobre estabilidad en almacenamiento	Se hicieron repeticiones de la película P4 debido a sus buenas características en comparación con la P5 y P6.
P5	2 g de almidón pregelatinizado 1 g de goma arábica 0.72 ml de glicerina	-Dificultad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Buena desintegración en la boca -Pegajosa	

		-Pobre estabilidad en almacenamiento	
P6	2 g de almidón pregelatinizado 0.48 ml de glicerina	-Facilidad para despegar del molde -Uniforme y lisa al tacto -Buena estabilidad -Mala desintegración en la boca	
P7	2 g de almidón pregelatinizado 2 g de goma arábica 0.96 ml de glicerina	-Dificultad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Buena desintegración en la boca -Muy pegajosa -Dificultad para manejarla -Pobre estabilidad en almacenamiento	A pesar de que las películas fueron almacenadas en condiciones controladas sus características no mejoraron. Se planteó agregar CMC (carboximetilcelulosa) para reducir o eliminar la pegajosidad. Además, se realizó una prueba solamente con CMC para observar su comportamiento.
P8	2 g de almidón pregelatinizado 2 g de goma arábica 0.96 l de glicerina	-Dificultad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Buena desintegración en la boca -Muy pegajosa -Dificultad para manejarla -Pobre estabilidad en almacenamiento	
P9	1 g de almidón pregelatinizado 0.24 ml de glicerina	-Solución filmogénica transparente y sin grumos -Facilidad para despegar del molde -No se rompe durante el secado en estufa -Uniforme y lisa al tacto -Buena estabilidad -Mala desintegración en la boca	Como respuesta a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores, se debe utilizar CMC en las películas de almidón pregelatinizado y goma arábica con la finalidad de darles firmeza y evitar su pegajosidad.
P10	1.5 g de almidón pregelatinizado 0.5 g de CMC 1 g de goma arábica 0.72 ml de glicerina	-Un poco de dificultad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Solución filmogénica final con grumos -Tarda más de lo esperado en desintegrarse en la boca -Mezcla muy viscosa -Pegajosidad elevada -Baja/Pobre estabilidad	Se debe reducir el contenido goma arábica y sustituir el almidón pregelatinizado por almidón soluble.
P11	1 g de almidón pregelatinizado 0.5 g de CMC 1 g de goma arábica 0.6 ml de glicerina	-Un poco de dificultad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Solución filmogénica final viscosa y con pocos grumos	

		<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tarda más de lo esperado en desintegrarse en la boca</li> <li>-Pegajosidad elevada</li> <li>-Baja/Pobre estabilidad</li> </ul>	
P12	<ul style="list-style-type: none"> <li>1.5 g de almidón soluble</li> <li>0.5 g de CMC</li> <li>1 g de goma arábica</li> <li>0.72 l de glicerina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Facilidad para despegar del molde</li> <li>-No se rompen durante el secado en estufa</li> <li>-Presenta buena elasticidad</li> <li>-Buena estabilidad</li> <li>-Película sin burbujas</li> <li>-No hay buena desintegración en la boca</li> <li>-Solución filmogénica bien integrada y sin grumos</li> </ul>	<p>Se recomendó modificar porcentajes de los componentes.  Nota: Agitar un poco a velocidad baja antes de verter en el molde para reducir o evitar burbujas.</p>
P13	<ul style="list-style-type: none"> <li>1.5 g de almidón soluble</li> <li>0.2 g de CMC</li> <li>0.8 g de goma arábica</li> <li>0.6 ml de glicerina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Facilidad para despegar del molde</li> <li>-No se rompen durante el secado en estufa</li> <li>-Delgada</li> <li>-Presenta buena elasticidad</li> <li>-Película sin burbujas</li> <li>-Buena estabilidad</li> <li>-Película sin burbujas</li> <li>-No hay buena desintegración en la boca</li> <li>-Solución filmogénica bien integrada y sin grumos</li> <li>-Leve pegajosidad</li> <li>-Los bordes de la película se pegaron entre sí</li> </ul>	
P14	<ul style="list-style-type: none"> <li>1.5 g de almidón soluble</li> <li>0.5 g de CMC</li> <li>0.5 g de goma arábica</li> <li>0.6 ml de glicerina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Facilidad para despegar del molde</li> <li>-No se rompen durante el secado en estufa</li> <li>-Delgada</li> <li>-Presenta buena elasticidad</li> <li>-Película con algunas burbujas</li> <li>-Buena estabilidad</li> <li>-Película sin burbujas</li> <li>-No hay buena desintegración en la boca</li> <li>-Solución filmogénica bien integrada y sin grumos</li> </ul>	<p>Después de probar las películas en la boca fue posible distinguir un ligero sabor amargo que probablemente se debió al uso del almidón soluble.  Se sugiere repetir la película P15 con almidón pregelatinizado.</p>
P15	<ul style="list-style-type: none"> <li>1 g de almidón soluble</li> <li>0.5 g de CMC</li> <li>0.5 g de goma arábica</li> <li>0.48 ml de glicerina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Facilidad para despegar del molde</li> <li>-No se rompen durante el secado en estufa</li> <li>-Delgada</li> <li>-Presenta buena elasticidad</li> <li>-Película sin burbujas</li> <li>-Buena estabilidad</li> <li>-Película sin burbujas</li> <li>-Buen tiempo y sensación de desintegración en la boca</li> <li>-Solución filmogénica bien integrada y sin grumos</li> </ul>	

		-No es pegajosa	
P16	1 g de almidón pregelatinizado 0.5 g de CMC 0.5 g de goma arábica 0.48 ml de glicerina	-Facilidad para despegar del molde -No se rompen durante el secado en estufa -Delgada -Presenta buena elasticidad -Película sin burbujas -Buena estabilidad -Película sin burbujas -Mejor tiempo y sensación de desintegración en la boca -No deja trazas o restos al desintegrarse en la boca -Solución filmogénica con pocos grumos -No es pegajosa	Se obtuvieron mejoras al utilizar almidón pregelatinizado en lugar de almidón soluble, debido a esto se seleccionó como matriz polimérica para agregar el resto de los componentes.
P17	1 g de almidón soluble 0.5 g de CMC 0.5 g de goma arábica 0.48 ml de glicerina <i>4.6 g de miel</i> <i>0.5 ml de aceite esencial</i> <i>10 ml de propóleos base agua</i>	-Dificultad para despegar del molde -No se rompe al secarse -Muy pegajosa -Muy elástica -Se desintegra en la boca -Color y aroma característico y llamativo -Dificultad para manejar y trabajar con ella -Baja/pobre estabilidad -Tiempo de desintegración bueno	Se sugirió elaborar una película con cada uno de los componentes (miel, aceite esencial, y propóleos) por separado para distinguir el ingrediente que le da la pegajosidad al material. Usar almidón pregelatinizado.
P18	1 g de almidón pregelatinizado 0.5 g de CMC 0.5 g de goma arábica 0.48 ml de glicerina <i>4.6 g de miel</i>	-Dificultad para despegar del molde -No se rompe al secarse -Es porosa -Dificultad para manejarla -Baja estabilidad -La miel otorga la pegajosidad a la película	Se comprobó que la miel otorgó la pegajosidad a la película anterior. Por lo tanto, se descartó el uso de la miel en la formulación.
P19	1 g de almidón pregelatinizado 0.5 g de CMC 0.5 g de goma arábica 0.48 ml de glicerina <i>0.5 ml de aceite esencial</i>	-Facilidad para despegar del molde -No se rompe al secarse -Ligeramente porosa -Se desintegra muy bien en la boca	
P20	1 g de almidón pregelatinizado 0.5 g de CMC 0.5 g de goma arábica 0.48 ml de glicerina <i>10 ml de propóleos</i>	-No se pudo despegar del molde -Olor de propóleos muy presente -No se probó en la boca -Solución filmogénica con pocos grumos	

### 3.4 Espectroscopia infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

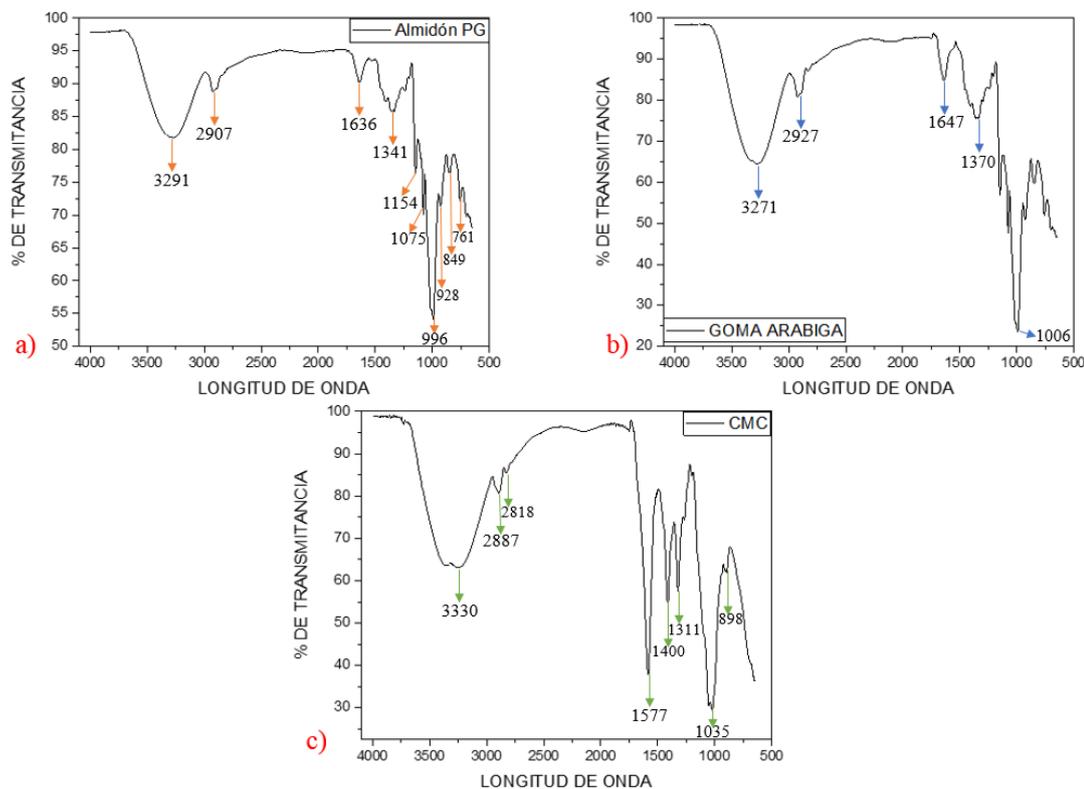
La espectroscopia FTIR fue utilizada para investigar la estructura química de cada uno de los componentes de la matriz polimérica de las PDO. La Figura 3.2 muestra los espectros FTIR del almidón pregelatinizado (APG), goma arábiga (GA) y carboximetilcelulosa (CMC).

La Figura 3.2a pertenece al espectro FTIR del almidón pregelatinizado, la banda a  $3291\text{ cm}^{-1}$  corresponde al estiramiento de los grupos  $-\text{OH}$  del almidón nativo [123]. Se observa una banda alrededor de los  $2907\text{ cm}^{-1}$  que se relaciona con las vibraciones C-H de los grupos alifáticos de la base hidrocarbonada del almidón [124]. Según lo reportado por Agama *et al.*, la intensidad de estas bandas disminuyó después de la pregelatinización y el secado al compararse con las del almidón nativo, lo que sugiere una reordenación de las moléculas de agua en la estructura del almidón [125]. El pico a  $1636\text{ cm}^{-1}$  puede atribuirse al agua absorbida en el almidón debido al proceso de pregelatinización al que fue sometido [126]. La transmitancia a  $1341\text{ cm}^{-1}$  está asociada a los grupos C-O del anillo aromático de los polisacáridos. En la región conocida como “huella dactilar”, se observan picos característicos del almidón en  $1154$  y  $1075\text{ cm}^{-1}$ . El pico centrado a  $996\text{ cm}^{-1}$  se puede asociar a los modos de estiramiento del hidroxilo (C-O) y su intensidad puede relacionarse a que tan amorfo puede ser el material. Los picos  $928$ ,  $849$  y  $761\text{ cm}^{-1}$  son atribuidos al anillo piranósico de los polisacáridos [127].

El espectro de FTIR de la goma arábiga (Figura 3.2b) muestra una amplia banda a  $3271\text{ cm}^{-1}$  debido a la vibración del estiramiento de los grupos  $-\text{OH}$ . Por otro lado, la banda ubicada a  $2927\text{ cm}^{-1}$  se asocia a la vibración del estiramiento asimétrico de  $\text{CH}_2$ . El pico a  $1647\text{ cm}^{-1}$  es causado por el estiramiento de los enlaces  $\text{C}=\text{O}$ . La banda en  $1370\text{ cm}^{-1}$  está asociada con  $-\text{OH}$  de grupos ácido carboxílico y el pico  $1006\text{ cm}^{-1}$  corresponde a la vibración del estiramiento asimétrico del enlace C-O-C del 1,3- $\beta$ -D-galactopiranosil [128].

Por último, la Figura 3.2c muestra el espectro FTIR de CMC en donde se puede observar una banda ancha en la región de  $3700$  a  $3000\text{ cm}^{-1}$  asignada a las vibraciones  $-\text{OH}$  y los picos de  $3000$  a  $2800\text{ cm}^{-1}$  relacionados con las bandas C-H. También es posible observar bandas vibratorias relacionadas con los tramos asimétricos ( $1577\text{ cm}^{-1}$ ) y simétricos ( $1400$  y  $1311\text{ cm}^{-1}$ ) carboxilatos ( $\text{COO}^-$ ). La forma ácida de CMC no se detectó en la muestra de polvo debido a la ausencia de las bandas características de los grupos carboxilo ( $-\text{COOH}$ ) generalmente observadas en  $1715$ – $1730\text{ cm}^{-1}$  y  $1240$ – $1250\text{ cm}^{-1}$ , que se asignan a la vibración de estiramiento antisimétrica de  $\text{C}=\text{O}$  y estiramiento de C-O, respectivamente. Se observaron vibraciones de

CO de alcoholes primarios y secundarios en la banda ubicada alrededor de  $1035\text{ cm}^{-1}$ . Se detectaron enlaces  $\beta$ -(1,4) glucosídicos entre unidades de glucosa a  $898\text{ cm}^{-1}$  [129], [130].



**Figura 3.2.** Espectros FTIR de a) almidón pregelatinizado, b) goma arábica y c) carboximetilcelulosa

### 3.5 Modelado de diseño de mezclas

#### 3.5.1 Efecto de los componentes sobre el contenido de CFT y propiedades mecánicas de PDO

En la Tabla 3.3, se reportan los coeficientes de regresión de los modelos ajustados para el contenido de CFT y las propiedades mecánicas. Acorde a los resultados, se encontraron que los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) mostraron un valor mayor a 0.70, lo cual significa que existe un buen ajuste de los datos experimentales.

Al analizar los modelos matemáticos relacionados con el contenido de fenoles totales (CFT) de la PDO, los términos lineales ( $x_1$ ,  $x_2$  y  $x_3$ ) y la interacción  $x_{13}$  fueron significativos ( $p < 0.05$ ).

La influencia de los componentes en la resistencia mecánica de las PDO se evaluó con base en coeficientes de modelado para el esfuerzo máximo. La inclusión de aceite esencial ejerció un efecto negativo sobre el esfuerzo máximo ( $x_2$  -61.74), es decir, cuando aumenta la

concentración de aceite esencial se reduce la resistencia de la película. Por otro lado, las interacciones  $x_{12}$  y  $x_{23}$  tuvieron un efecto positivo más significativo en la respuesta produciendo películas más resistentes (Tabla 3.3).

La elongación está relacionada con la deformabilidad que presenta un material. Se observó un efecto positivo ( $x_2$  948.20) con la adición de aceite esencial. Al mismo tiempo, las interacciones  $x_{12}$  (-1109.15) y  $x_{23}$  (-778.97) tuvieron un efecto negativo más significativo en la respuesta dando como resultado películas menos deformables.

Por otro lado, el módulo de Young o módulo elástico está relacionado con la rigidez de la película. Los valores más altos del módulo de Young indican un material más rígido. Se observó un efecto negativo con la adición de aceite esencial ( $x_2$  -1425.86), lo que se traduce como películas más flexibles al aumentar la concentración de aceite esencial, esto posiblemente se deba a que se esté comportando como un plastificante. Sin embargo, las interacciones  $x_{12}$  y  $x_{23}$  tuvieron un efecto positivo más significativo en la respuesta dando como resultado películas más rígidas. El incremento de la rigidez del sistema lleva asociado una disminución de la deformabilidad del material cuando es sometido a los esfuerzos de tensión.

**Tabla 3.3.** Coeficientes de regresión de los modelos cuadráticos para actividad antioxidante y propiedades mecánicas.

Coeficientes de regresión <sup>a</sup>	Actividad antioxidante y propiedades mecánicas			
	CFT	Esfuerzo Máximo	Elongación	Módulo de Young
$x_1$	24.05*	0.94*	22.60*	12.29
$x_2$	-35.59*	-61.74*	948.20*	-1425.86
$x_3$	14.76*	2.39*	-0.74*	58.55
$x_{12}$	61.37	83.17*	-1109.15*	1803.02*
$x_{13}$	-15.95*	-3.32*	182.80*	-139.84*
$x_{23}$	56.43	69.76*	-778.97*	1509.24*
$R^2$	0.937	0.808	0.767	0.741

a:  $x_1$ = propóleos,  $x_2$  = aceite esencial,  $x_3$  = polímero,  $x_{12}$  = propóleos + aceite esencial,  $x_{13}$  = propóleos + polímero,  $x_{23}$  = aceite esencial + polímero.

CFT = Compuestos Fenólicos Totales

\*Significativo ( $p < 0.05$ )

### 3.5.2 Análisis de Varianza (ANOVA)

Los resultados de ANOVA para las PDO confirmaron la significancia del modelo cuadrático para las variables de respuesta: CFT y propiedades mecánicas (Tabla 3.4). Los valores de  $R^2$  para el modelo generado para CFT como factor de respuesta fueron 0.93, para esfuerzo máximo fueron 0.80, para elongación fueron 0.76 y para módulo de Young como factor de respuesta fueron 0.74.

En el diseño de mezclas, el valor F entre las variables del componente de la mezcla ayuda a predecir las interacciones entre ellas. Un valor F alto entre dos variables sugiere interacciones altas y un valor F bajo sugiere interacciones bajas entre ellas. Para CFT como variable de respuesta, la interacción binaria  $x_{13}$  mostro el valor F más alto de 47.63 y las interacciones binarias  $x_{12}$  y  $x_{23}$  dieron valor de F más bajos de 2.60 y 2.35, respectivamente. Para el esfuerzo máximo como variable de respuesta, la interacción  $x_{12}$  mostro el valor F más alto de 98.80, seguido de la interacción  $x_{23}$  con un valor F de 74.17 y la interacción  $x_{13}$  dio el valor más bajo de 42.38. En cuanto a la elongación como variable de respuesta, el valor F más alto lo mostro la interacción binaria  $x_{13}$  de 70.26 y las interacciones binarias  $x_{12}$  y  $x_{23}$  dieron valor de F más bajos de 9.54.60 y 5.02, respectivamente. En el caso del módulo de Young como variable de respuesta, la interacción binaria  $x_{13}$  mostro el valor F más alto de 92.48, seguido de la interacción binaria  $x_{12}$  con un valor F de 56.72 y la interacción binaria  $x_{23}$  dio el valor más bajo de 42.40.

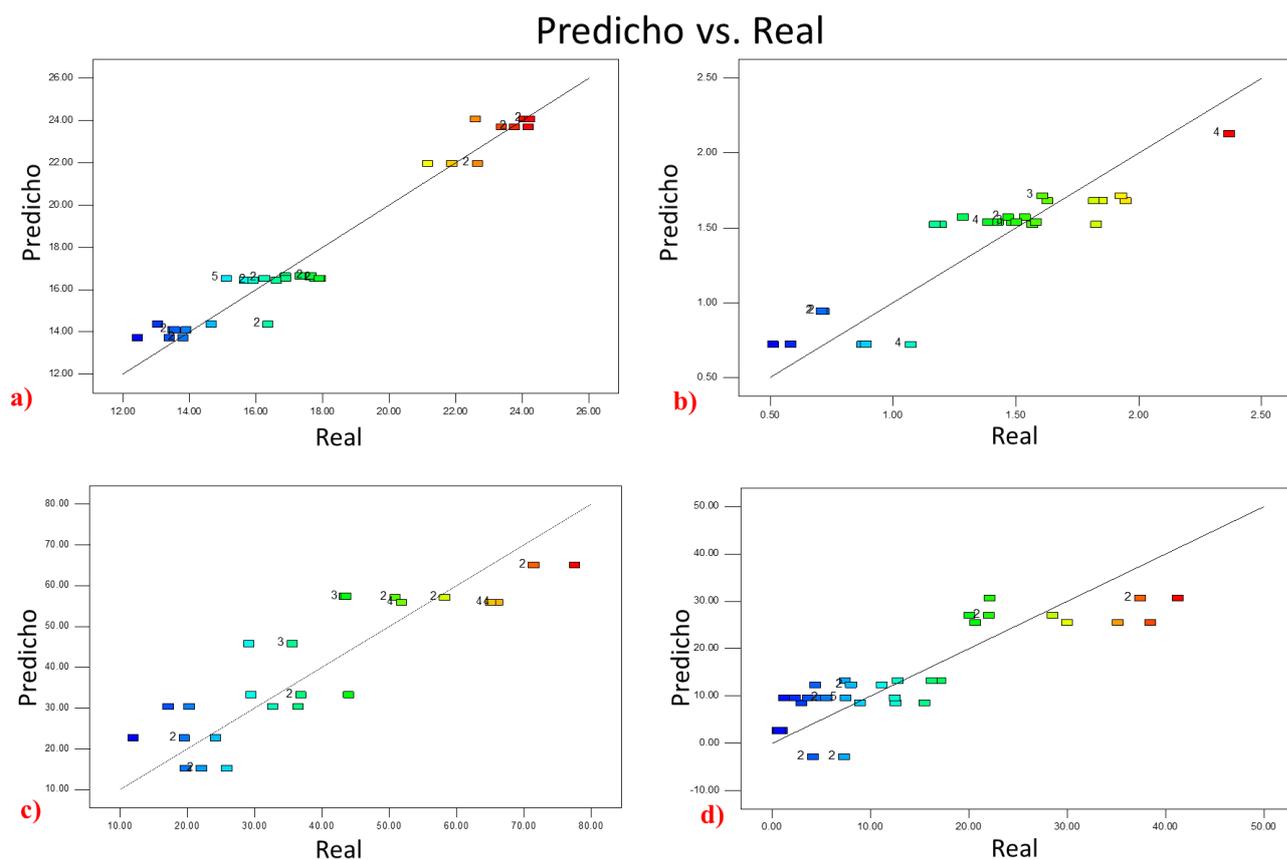
**Tabla 3.4.** Análisis de varianza para compuestos fenólicos totales y propiedades mecánicas como variables de repuesta de la PDO.

Variables de respuesta	Análisis de varianza						
	Fuente	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	Valor F	p-Valor Prop > F	Comentarios
<i>CFT</i>	Modelo	566.63	5	133.33	113.32	< 0.0001	significativo
	Mezcla Lineal	506.93	2	253.47	253.45	< 0.0001	
	$x_{12}$	2.60	1	2.60	2.60	0.1151	
	$x_{13}$	47.63	1	47.63	47.63	< 0.0001	
	$x_{23}$	2.35	1	2.35	2.35	0.1340	
	Residual	38.00	38	1.00			
	Cor Total	604.63	43				

<b><i>Esfuerzo Máximo</i></b>	Modelo	7.77	5	1.55	32.14	< 0.0001	significativo
	Mezcla Lineal	0.86	2	0.43	8.87	0.0007	
	$x_{12}$	4.78	1	4.78	98.80	< 0.0001	
	$x_{13}$	2.06	1	2.06	42.56	< 0.0001	
	$x_{23}$	3.59	1	3.59	74.17	< 0.0001	
	Residual	1.84	38	0.048			
	Cor Total	9.61	43				
<b><i>Elongación</i></b>	Modelo	11169.62	5	2233.92	25.10	< 0.0001	significativo
	Mezcla Lineal	4296.73	2	2148.36	24.14	< 0.0001	
	$x_{12}$	849.35	1	849.35	9.54	0.0037	
	$x_{13}$	6254.26	1	6254.26	70.26	< 0.0001	
	$x_{23}$	446.97	1	446.97	5.02	0.0310	
	Residual	3382.54	38	89.01			
	Cor Total	14552.16	43				
<b><i>Módulo de Young</i></b>	Modelo	4313.40	5	862.68	21.80	< 0.0001	significativo
	Mezcla Lineal	14.28	2	7.14	0.18	0.8357	
	$x_{12}$	2244.42	1	2244.42	56.72	< 0.0001	
	$x_{13}$	3659.62	1	3659.62	92.48	< 0.0001	
	$x_{23}$	1677.86	1	1677.86	42.40	< 0.0001	
	Residual	1503.80	38	39.57			
	Cor Total	5817.19	43				

### 3.5.3 Diagnósticos

Los diagnósticos de compuestos fenólicos totales (CFT), esfuerzo máximo, elongación y módulo de Young como variables de respuesta de la formulación de PDO se muestran en la Figura 10. Los gráficos demuestran que los valores de las variables dependientes están ubicados alrededor de la línea recta; lo que sugiere la existencia de un alto grado de similitud entre los valores reales y los valores predichos (Fig. 3.3a, 3.3b, 3.3c y 3.3d).

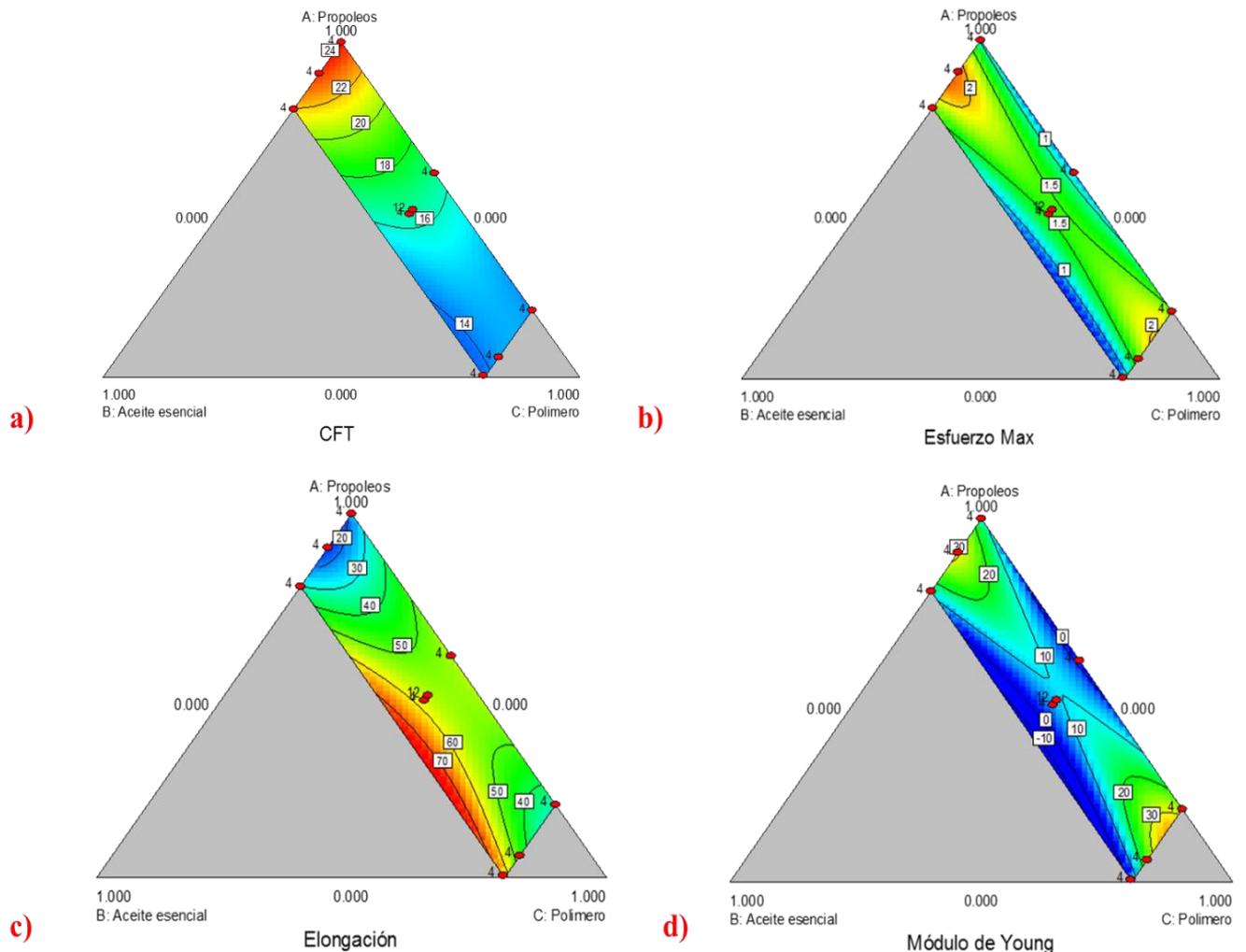


**Figura 3.3.** Gráficos de valores reales y predichos por el modelo para PDO: a) compuestos fenólicos totales (CFT), b) esfuerzo máximo, c) elongación y d) módulo de Young.

### 3.5.4 Gráficos modelo

Los gráficos de contorno (Figura 3.4) se desarrollaron para determinar la proporción óptima de propóleos, aceite esencial y polímero en la mezcla de componentes para la formulación de la película de desintegración oral (PDO) sobre un modelo cuadrático.

La Figura 3.4a, correspondiente al contenido de CFT mostró un valor alto de 24.225 mg EAG/g de película para mezclas con una alta proporción de propóleos y aceite esencial con una proporción baja de polímero.



**Figura 3.4.** Gráficos de contorno para las variables de respuesta: a) Compuestos Fenólicos Totales (CFT), b) esfuerzo máximo, c) Elongación y d) Módulo de Young.

### 3.5.5 Optimización

Las respuestas de esfuerzo máximo y contenido de CFT fueron utilizados para realizar la optimización multi-respuesta. El principal objetivo del proceso de optimización fue maximizar de forma simultánea el contenido de CFT y esfuerzo máximo de PDO. De acuerdo a las soluciones de la optimización numérica y al factor de deseabilidad (0.920) se seleccionó las siguientes condiciones óptimas: propóleos = 74.82 % (0.888); aceite esencial = 6.48 %

(0.112) y polímero = 19 % (0) (Figura 3.5). Los valores predichos por el modelo resultaron: 23.47 mg EAG/g de POD y 2.19 MPa para contenido CFT y esfuerzo máximo, respectivamente.

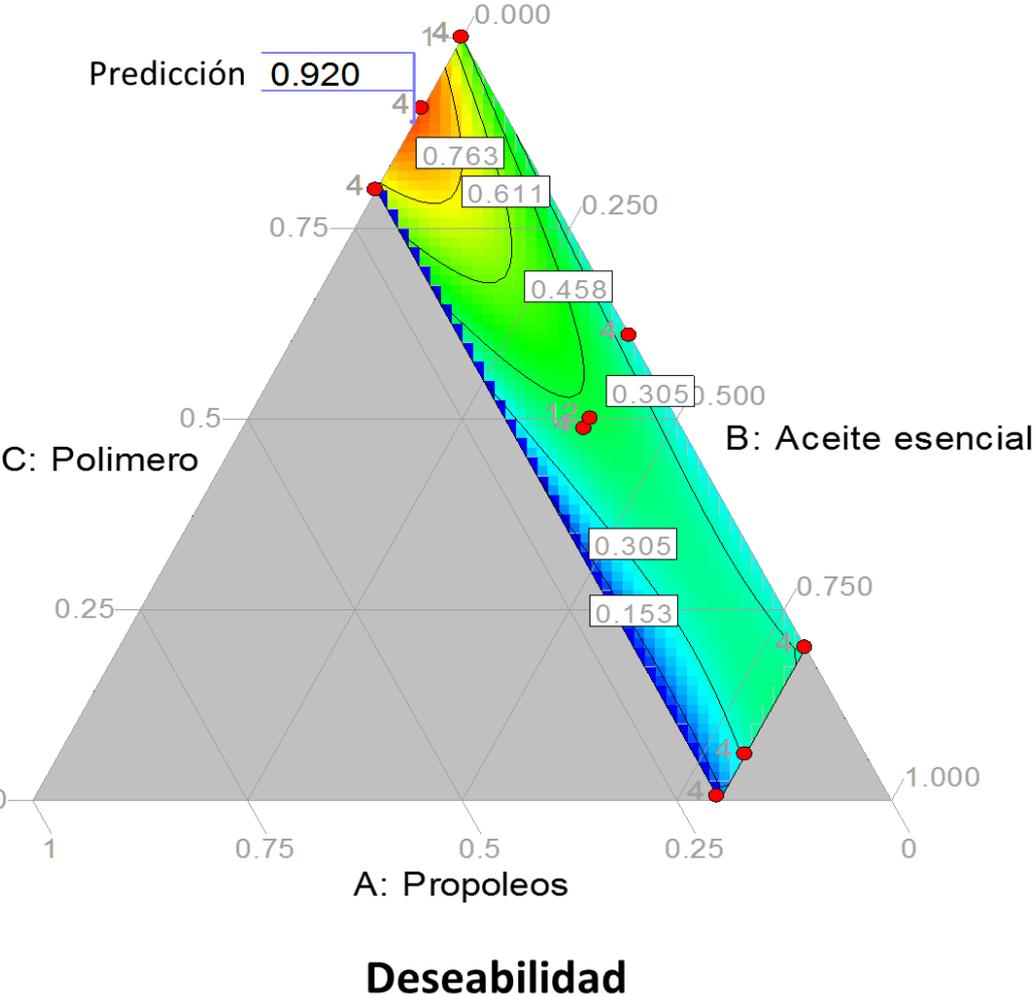


Figura 3.5. Optimización numérica para maximizar el contenido de CFT y esfuerzo máximo de PDO

## CONCLUSIONES

El trabajo presentado demostró la importancia de un diseño experimental de mezclas para la formulación y evaluación de películas de desintegración oral (PDO) cargado con principios activos de un extracto comercial de propóleos.

En base a los hallazgos más importantes del trabajo, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- El extracto comercial de propóleos se caracterizó con un contenido promedio de compuestos fenólicos totales, flavonoides totales y actividad antioxidante comparable a lo reportado en la literatura; lo cual confirma su potencial bioactivo.
- El perfil cromatográfico de compuestos fenólicos del extracto de propóleos resultó similar a lo reportado para propóleos de origen Europeo, en donde se identificaron tres ácidos hidroxicinámicos, un flavanol, tres flavonoles, una flavonona y dos flavonas, lo cual posiblemente éstos compuestos contribuyen a la actividad antioxidante.
- Con base a las pruebas preliminares, se seleccionó el tipo de polímero y se determinó la composición de los polímeros (almidón pregelatinizado, CMC y goma arábiga) para la elaboración de una PDO delgada, flexible, estable, con buena adherencia al molde, pero con facilidad para ser despegada, con sabor y sensación agradable.
- Los espectros FTIR de los componentes de la PDO demuestran una presencia predominante de carbohidratos y proteínas, mostrando una buena interacción entre ellos.
- El modelo cuadrático para CFT y propiedades mecánicas de PDO fueron significativos y los valores de coeficientes de determinación tuvieron valores superiores a 0.7, demostrando un buen ajuste de los datos experimentales. La interacción binaria propóleos-aceite esencial contribuyó en el mejoramiento de la resistencia máxima de PDO.
- El nivel óptimo de cada componente de la mezcla para la obtención de una PDO resistente y con mayor contenido de CFT fue: 74.82 % de propóleos, 6.48 % de aceite esencial de mandarina y 19 % de polímero (almidón pregelatinizado, carboximetilcelulosa y goma arábiga).

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] H. Landová, D. Vetchý, J. Gajdziok, P. Doležel, J. Muselík, K. Dvořáčková, and Z. Knotek, “Evaluation of the influence of formulation and process variables on mechanical properties of oral mucoadhesive films using multivariate data analysis,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp.1-9, 2014.
- [2] L. de A. S. de Toledo, M. I. Bavato, H. C. Rosseto, R. Cortesi, and M. L. Bruschi, “Pharmaceutical films made from the waste material from the preparation of propolis extracts: development and characterization,” *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 51, no. 4, pp. 847–859, 2015.
- [3] S. D. Barnhart and M. S. Sloboda, “The future of dissolvable films,” *Drug Deliv Technol.*, vol. 7, no. 8, pp. 34–37, 2007.
- [4] E. M. Hoffmann, A. Breitenbach, and J. Breitreutz, “Advances in orodispersible films for drug delivery,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 8, no. 3, pp. 299–316, 2011.
- [5] T. Nagaraju, R. Gowthami, M. Rajashekar, S. Sandeep, M. Mallesham, D. Sathish, and Y. Shravan Kumar, “Comprehensive review on oral disintegrating films,” *Curr. Drug Deliv.*, vol. 10, no. 1, pp. 96–108, 2013.
- [6] V. A. dos Santos Garcia, J. Gonçalves Borges, M. R. Mazalli, J. das G. Lapa-Guimarães, F. M. Vanin, and R. A. de Carvalho, “Gelatin and pregelatinized starch orally disintegrating films: Properties and stability of vitamin C,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 134, no. 20, 2017.
- [7] H. Kathpalia and A. Patil, “Formulation and evaluation of orally disintegrating films of levocetirizine dihydrochloride,” *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 79, no. 2, pp. 204–211, 2017.
- [8] P. Sanjay, V. N. Gupta, D. V Gowda, and P. Sivadasu, “Formulation and evaluation of oral disintegrating film of atenolol,” *Asian J. Pharm. Clin. Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 312–315, 2018.
- [9] N. M. G. Almeida, T. J. Lopes, and M. V. Chaud, “Desenvolvimento de uma formulação de cloridrato de metoclopramida sob a forma de filme hidrogelatinoso,” *Rev Bras Farm.*, vol. 93, no. 1, pp. 114–119, 2012.
- [10] H. Seager, “Drug-delivery products and the Zydis fast-dissolving dosage form,” *J.*

- Pharm. Pharmacol.*, vol. 50, no. 4, pp. 375–382, 1998.
- [11] S. Mazumder, N. Pavurala, P. Manda, X. Xu, C. N. Cruz, and Y. S. R. Krishnaiah, “Quality by Design approach for studying the impact of formulation and process variables on product quality of oral disintegrating films,” *Int. J. Pharm.*, vol. 527, no. 1–2, pp. 151–160, 2017.
- [12] Y. Takeuchi, K. Umemura, K. Tahara, and H. Takeuchi, “Formulation design of hydroxypropyl cellulose films for use as orally disintegrating dosage forms,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 46, pp. 93–100, 2018.
- [13] J. G. Borges and R. A. De Carvalho, “Orally disintegrating films containing propolis: properties and release profile,” *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 4, pp. 1431–1439, 2015.
- [14] P. G. Pietta, C. Gardana, and A. M. Pietta, “Analytical methods for quality control of propolis,” *Fitoterapia*, vol. 73, pp. S7–S20, 2002.
- [15] D. O. de la Federación, “Norma Oficial Mexicana: Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento,” NOM-003-SAG/GAN-2017, 2017.
- [16] M. Slavkova and J. Breitzkreutz, “Orodispersible drug formulations for children and elderly,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 75, pp. 2–9, 2015.
- [17] Y. G. Jadhav, U. C. Galgatte, and P. D. Chaudhari, “Challenges in formulation development of fast dissolving oral films,” *J. Pharm Res.*, vol. 3, no. 8, 2013.
- [18] R. P. Dixit and S. P. Puthli, “Oral strip technology: overview and future potential,” *J. Control. release*, vol. 139, no. 2, pp. 94–107, 2009.
- [19] V. I. Garsuch, *Preparation and characterization of fast-dissolving oral films for pediatric use*. Cuvillier Verlag, pp. 140, 2009.
- [20] B. G. Prajapati and N. Ratnakar, “A review on recent patents on fast dissolving drug delivery system,” *Int. J. PharmTech Res.*, vol. 1, no. 3, pp. 790–798, 2009.
- [21] F. Cilurzo, I. E. Cupone, P. Minghetti, F. Selmin, and L. Montanari, “Fast dissolving films made of maltodextrins,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 70, no. 3, pp. 895–900, 2008.
- [22] C. Corniello, “Quick dissolving strips: from concept to commercialization,” *Drug Deliv.*

- Technol.*, vol. 6, no. 2, pp. 68–71, 2006.
- [23] K. K. Peh and C. F. Wong, “Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties,” *J Pharm Pharm Sci*, vol. 2, no. 2, pp. 53–61, 1999.
- [24] U. S. FDA, “Guidance for industry orally disintegrating tablets,” *Silver Spring, MD Off. Pharm. Sci. Cent. Drug Eval. Res. Food Drug Adm.*, 2008.
- [25] S. Kohl, “European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (EDQM): final report of the pharmaceutical care quality indicators project published.” Bmj publishing group british med assoc house, tavistock square, London, 2018.
- [26] S. D. Barnhart, M. Rathbone, J. Hadgraft, M. Roberts, and M. Lane, “Thin film oral dosage forms,” *Drugs Pharm. Sci.*, vol. 183, p. 209, 2008.
- [27] V. Garsuch and J. Breitzkreutz, “Novel analytical methods for the characterization of oral wafers,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 73, no. 1, pp. 195–201, 2009.
- [28] V. Garsuch and J. Breitzkreutz, “Comparative investigations on different polymers for the preparation of fast-dissolving oral films,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 62, no. 4, pp. 539–545, 2010.
- [29] R. Mishra and A. Amin, “Manufacturing techniques of orally dissolving films,” *Pharm. Technol.*, vol. 35, no. 1, pp. 70–73, 2011.
- [30] A. Arya, A. Chandra, V. Sharma, and K. Pathak, “Fast dissolving oral films: an innovative drug delivery system and dosage form,” *Int. J. ChemTech Res.*, vol. 2, no. 1, pp. 576–583, 2010.
- [31] M. Siewert, J. Dressman, C. K. Brown, V. P. Shah, J. M. Aiache, N. Aoyagi and R. Williams, “FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms,” *Aaps Pharmscitech*, vol. 4, no. 1, pp. 43–52, 2003.
- [32] A. J. Shinde, K. C. Garala, and H. N. More, “Development and characterization of transdermal therapeutics system of tramadol hydrochloride,” *Asian J. Pharm. Free full text Artic. from Asian J Pharm*, vol. 2, no. 4, 2014.
- [33] S. Verma, “Polymers in designing the mucoadhesive films: A comprehensive review,”

*Int. J. Green Pharm.*, vol. 12, no. 02, p. S330-S344, 2018.

- [34] J. S. Boateng, A. D. Auffret, K. H. Matthews, M. J. Humphrey, H. N. E. Stevens, and G. M. Eccleston, "Characterisation of freeze-dried wafers and solvent evaporated films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces," *Int. J. Pharm.*, vol. 389, no. 1–2, pp. 24–31, 2010.
- [35] J. S. Boateng, K. H. Matthews, A. D. Auffret, M. J. Humphrey, H. N. Stevens, and G. M. Eccleston, "In vitro drug release studies of polymeric freeze-dried wafers and solvent-cast films using paracetamol as a model soluble drug," *Int. J. Pharm.*, vol. 378, no. 1–2, pp. 66–72, 2009.
- [36] M. Haag, M. Brüning, and K. Molt, "Quantitative analysis of diphenhydramine hydrochloride in pharmaceutical wafers using near infrared and Raman spectroscopy," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 395, no. 6, pp. 1777–1785, 2009.
- [37] S. V.S. Tumuluri, S. Prodduturi, M. M. Crowley, S. P. Stodghill, J. W. McGinity, M. A. Repka, and B. A. Avery, "The use of near-infrared spectroscopy for the quantitation of a drug in hot-melt extruded films," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 30, no. 5, pp. 505–511, 2004.
- [38] A. Dinge and M. Nagarsenker, "Formulation and evaluation of fast dissolving films for delivery of triclosan to the oral cavity," *Aaps Pharmscitech*, vol. 9, no. 2, pp. 349–356, 2008.
- [39] R. C. Mashru, V. B. Sutariya, M. G. Sankalia, and P. P. Parikh, "Development and evaluation of fast-dissolving film of salbutamol sulphate," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 31, no. 1, pp. 25–34, 2005.
- [40] M. A. Repka, S. Prodduturi, and S. P. Stodghill, "Production and characterization of hot-melt extruded films containing clotrimazole," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 29, no. 7, pp. 757–765, 2003.
- [41] M. J. Chen, G. Tirol, C. Bass, C. M. Corniello, G. Watson, and I. Sanchez, "Castable edible pharmaceutical films," *Drug Del Tech*, vol. 8, no. 6, pp. 35–41, 2008.
- [42] S. Gaisford, A. Verma, M. Saunders, and P. G. Royall, "Monitoring crystallisation of drugs from fast-dissolving oral films with isothermal calorimetry," *Int. J. Pharm.*, vol.

- 380, no. 1–2, pp. 105–111, 2009.
- [43] J. S. Boateng, H. N. E. Stevens, G. M. Eccleston, A. D. Auffret, M. J. Humphrey, and K. H. Matthews, “Development and mechanical characterization of solvent-cast polymeric films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 35, no. 8, pp. 986–996, 2009.
- [44] F. Cilurzo *et al.*, “Nicotine fast dissolving films made of maltodextrins: a feasibility study,” *Aaps Pharmscitech*, vol. 11, no. 4, pp. 1511–1517, 2010.
- [45] R. Mishra and A. Amin, “Formulation and characterization of rapidly dissolving films of cetirizine hydrochloride using pullulan as a film forming agent,” *Indian J. Pharm. Educ. Res.*, vol. 45, no. 1, pp. 71–77, 2011.
- [46] Y. Murata, T. Isobe, K. Kofuji, N. Nishida, and R. Kamaguchi, “Preparation of fast dissolving films for oral dosage from natural polysaccharides,” *Materials (Basel)*, vol. 3, no. 8, pp. 4291–4299, 2010.
- [47] X. Parissaux, A. A. Joshi, A. Francois, and P. Lefevre, “Evaluation of a novel modified starch polymer in an easy to formulate thin-film drug delivery system and comparison with some marketed formulations,” *Young*, vol. 1070, no. 804, p. 323, 2007.
- [48] D. A. El-Setouhy and N. S. Abd El-Malak, “Formulation of a novel tianeptine sodium orodispersible film,” *Aaps Pharmscitech*, vol. 11, no. 3, pp. 1018–1025, 2010.
- [49] Y. Sakuda, A. Ito, M. Sasatsu, and Y. Machida, “Preparation and evaluation of medicinal carbon oral films,” *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 58, no. 4, pp. 454–457, 2010.
- [50] V. M. Ghorwade, “Formulation and Evaluation of Montelukast Sodium Fast Dissolving Films.” RGUHS, pp. 266-270, 2011.
- [51] R. Hoover, T. Hughes, H. J. Chung, and Q. Liu, “Composition, molecular structure, properties, and modification of pulse starches: A review,” *Food Res. Int.*, vol. 43, no. 2, pp. 399–413, 2010.
- [52] Z. Fu, L. Wang, D. Li, and B. Adhikari, “Effects of partial gelatinization on structure and thermal properties of corn starch after spray drying,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 88, no. 4, pp. 1319–1325, 2012.

- [53] X. H. Zia-ud-Din and P. Fei, “Physical and chemical modification of starches: A review,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 57, no. 12, pp. 2691–2705, 2017.
- [54] M. Miyazaki, P. Van Hung, T. Maeda, and N. Morita, “Recent advances in application of modified starches for breadmaking,” *Trends food Sci. Technol.*, vol. 17, no. 11, pp. 591–599, 2006.
- [55] L. Sánchez, S. Torrado, and J. Lastres, “Gelatinized/freeze-dried starch as excipient in sustained release tablets,” *Int. J. Pharm.*, vol. 115, no. 2, pp. 201–208, 1995.
- [56] A. O. Ashogbon and E. T. Akintayo, “Recent trend in the physical and chemical modification of starches from different botanical sources: A review,” *Starch-Stärke*, vol. 66, no. 1–2, pp. 41–57, 2014.
- [57] G. Sacchetti, G. G. Pinnavaia, E. Guidolin, and M. Dalla Rosa, “Effects of extrusion temperature and feed composition on the functional, physical and sensory properties of chestnut and rice flour-based snack-like products,” *Food Res. Int.*, vol. 37, no. 5, pp. 527–534, 2004.
- [58] M. E. Camire, A. Camire, and K. Krumhar, “Chemical and nutritional changes in foods during extrusion,” *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 29, no. 1, pp. 35–57, 1990.
- [59] M. P. Adinugraha and D. W. Marseno, “Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT),” *Carbohydr. Polym.*, vol. 62, no. 2, pp. 164–169, 2005.
- [60] E. Terán and R. E. Vásquez, “Obtención de carboximetilcelulosa a partir de linter de algodón,” *Rev. Investig. Desarro.*, vol. 1, no. 7, 2008.
- [61] V. C. F. Burgardt, L. C. B. Züge, G. de Bonna Sartor, N. Waszczynskyj, J. L. M. Silveira, and C. W. I. Haminiuk, “The addition of carboxymethylcellulose in caseinomacropptide acid gels: Rheological, optical and microstructural characteristics,” *Food Hydrocoll.*, vol. 49, pp. 11–17, 2015.
- [62] A. G. Gaonkar, N. Vasisht, A. R. Khare, and R. Sobel, *Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide*. Elsevier, p. 917, 2014.
- [63] R. L. de Oliveira, H. da Silva Barud, D. T. B. De Salvi, G. F. Perotti, S. J. L. Ribeiro, and V. R. L. Constantino, “Transparent organic–inorganic nanocomposites membranes

- based on carboxymethylcellulose and synthetic clay,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 69, pp. 415–423, 2015.
- [64] T. Taubner, A. Synytsya, and J. Čopíková, “Preparation of amidated derivatives of carboxymethylcellulose,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 72, pp. 11–18, 2015.
- [65] X. Geng, B. Cui, Y. Li, W. Jin, Y. An, B. Zhou, and B. Li, “Preparation and characterization of ovalbumin and carboxymethyl cellulose conjugates via glycosylation,” *Food Hydrocoll.*, vol. 37, pp. 86–92, 2014.
- [66] Z. Li, Y. Wang, Y. Pei, W. Xiong, C. Zhang, W. Xu, and B. Li, “Curcumin encapsulated in the complex of lysozyme/carboxymethylcellulose and implications for the antioxidant activity of curcumin,” *Food Res. Int.*, vol. 75, pp. 98–105, 2015.
- [67] T. Fekete, J. Borsa, E. Takács, and L. Wojnárovits, “Synthesis of carboxymethylcellulose/acrylic acid hydrogels with superabsorbent properties by radiation-initiated crosslinking,” *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 124, pp. 135–139, 2016.
- [68] G. Wu, R.-Y. Dai, W.-G. Li, P.-P. Yin, H.-Z. Chen, and M. Wang, “Preparation of stable gelatin/sodium carboxymethylcellulose/sodium lauryl sulfonate microcapsules with ultra-thin capsule wall for electrophoretic displays,” *Curr. Appl. Phys.*, vol. 11, no. 3, pp. 321–326, 2011.
- [69] R. C. Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, *Handbook of pharmaceutical excipients*. Libros Digitales-Pharmaceutical Press, 2009.
- [70] P. R. Sarika, N. R. James, P. R. A. Kumar, D. K. Raj, and T. V Kumary, “Gum arabic-curcumin conjugate micelles with enhanced loading for curcumin delivery to hepatocarcinoma cells,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 134, pp. 167–174, 2015.
- [71] S. Sarkar, S. Gupta, P. S. Variyar, A. Sharma, and R. S. Singhal, “Hydrophobic derivatives of guar gum hydrolyzate and gum Arabic as matrices for microencapsulation of mint oil,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 95, no. 1, pp. 177–182, 2013.
- [72] F. Ma, A. E. Bell, F. J. Davis, and Y. Chai, “Effects of high hydrostatic pressure and chemical reduction on the emulsification properties of gum arabic,” *Food Chem.*, vol. 173, pp. 569–576, 2015.
- [73] F. Thevenet, “Acacia gums: natural encapsulation agent for food ingredients,” ACS

Publications, pp. 51-59, 1995.

- [74] A. K. Nayak, B. Das, and R. Maji, "Calcium alginate/gum Arabic beads containing glibenclamide: development and in vitro characterization," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 51, no. 5, pp. 1070–1078, 2012.
- [75] A. Ali, M. Maqbool, S. Ramachandran, and P. G. Alderson, "Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit," *Postharvest Biol. Technol.*, vol. 58, no. 1, pp. 42–47, 2010.
- [76] R. Velasco M. and V. Ortiz G., "Composición y procesamiento de películas biodegradables basadas en almidón" *Biotechnol. en el Sect. Agropecu. y Agroindustrial*, vol. 10, no. 1, pp. 182-192, 2012.
- [77] M. N. Siddiqui, G. Garg, and P. K. Sharma, "A short review on 'A novel approach in oral fast dissolving drug delivery system and their patents,'" *Adv Biol Res*, vol. 5, no. 6, pp. 291–303, 2011.
- [78] A. R. Patel, D. S. Prajapati, and J. A. Raval, "Fast dissolving films (FDFs) as a newer venture in fast dissolving dosage forms," *Int J Drug Dev Res*, vol. 2, no. 2, pp. 232–246, 2010.
- [79] V. Rathi, V. Senthil, L. Kammili, and R. Hans, "A brief review on oral film technology.," *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.*, vol. 2, no. 4, 2011.
- [80] M. Dahiya, S. Saha, and A. F. Shahiwala, "A review on mouth dissolving films," *Curr. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 5, pp. 469–476, 2009.
- [81] Y. S. Pathare, V. S. Hastak, and A. N. Bajaj, "Polymers used for fast disintegrating oral films: a review," *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, vol. 21, no. 1, pp. 169–178, 2013.
- [82] P. P. Ghodake, K. M. Karande, R. A. Osmani, R. R. Bhosale, B. R. Harkare, and B. B. Kale, "Mouth dissolving films: Innovative vehicle for oral drug delivery," *Polymer (Guildf)*, vol. 9, p. 20, 2013.
- [83] A. Jyoti, S. Gurpreet, S. Seema, and A. C. Rana, "Fast dissolving films: A novel approach to oral drug delivery," *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 2, no. 12, pp. 69–74, 2011.

- [84] A. Mahajan, N. Chhabra, and G. Aggarwal, "Formulation and characterization of fast dissolving buccal films: A review," *Der Pharm. Lett.*, vol. 3, no. 1, pp. 152–165, 2011.
- [85] K. Ravi Kumar and M. Mercy Sulochana, "Fast dissolving films: a unique strategy for drug delivery," *Asian J. Pharm. Res*, vol. 4, no. 1, pp. 47–55, 2014.
- [86] N. Khatoon, N. G. R. Rao, and B. M. Reddy, "Overview on fast dissolving oral films," *Int. J. Chem. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 63–75, 2013.
- [87] V. S. Bankova, S. L. de Castro, and M. C. Marcucci, "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," *Apidologie*, vol. 31, no. 1, pp. 3–15, 2000.
- [88] A. H. Banskota, Y. Tezuka, and S. Kadota, "Recent progress in pharmacological research of propolis," *Phyther. Res.*, vol. 15, no. 7, pp. 561–571, 2001.
- [89] A. Salatino, C. C. Fernandes-Silva, A. A. Righi, and M. L. F. Salatino, "Propolis research and the chemistry of plant products," *Nat. Prod. Rep.*, vol. 28, no. 5, pp. 925–936, 2011.
- [90] M. Viuda-Martos, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J. A. Pérez-Álvarez, "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly," *J. Food Sci.*, vol. 73, no. 9, pp. R117–R124, 2008.
- [91] F. Galeotti, F. Maccari, A. Fachini, and N. Volpi, "Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products," *Foods*, vol. 7, no. 3, p. 41, 2018.
- [92] I. Ghebre-Sellassie, C. E. Martin, F. Zhang, and J. DiNunzio, *Pharmaceutical extrusion technology*. CRC Press, p. 474, 2018.
- [93] M. Koster and M. Thommes, "Hot-Melt Extrusion-a new production technique for oral applicable films," pp. 787-797, 2010.
- [94] J. Breitschütz, "Schnell zerfallende orale Arzneiformen," *Innov. Arzneiformen. K Mäder und U Weidenauer. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, pp. 37–52, 2010.
- [95] H. G. Pulido, R. De la Vara Salazar, P. G. González, C. T. Martínez, and M. del C. T. Pérez, *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw-Hill New York, NY, USA:, 2012.
- [96] E. M. Kuskoski, A. G. Asuero, A. M. Troncoso, J. Mancini-Filho, and R. Fett, "Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em

- polpa de frutas,” *Food Sci. Technol.*, vol. 25, no. 4, pp. 726–732, 2005.
- [97] V. L. Singleton and J. A. Rossi, “Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents,” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158, 1965.
- [98] G. A. González-Aguilar, M. A. Villegas-Ochoa, M. A. Martínez-Téllez, A. A. Gardea, and J. F. Ayala-Zavala, “Improving antioxidant capacity of fresh-cut mangoes treated with UV-C,” *J. Food Sci.*, vol. 72, no. 3, pp. S197–S202, 2007.
- [99] C. A. Can-Cauich *et al.*, “Tropical fruit peel powders as functional ingredients: Evaluation of their bioactive compounds and antioxidant activity,” *J. Funct. Foods*, vol. 37, pp. 501–506, 2017.
- [100] V. M. Moo-Huchin *et al.*, “Determination of some physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity of tropical fruits from Yucatan, Mexico,” *Food Chem.*, vol. 152, pp. 508–515, 2014.
- [101] F. M. Pelissari, F. Yamashita, M. A. Garcia, M. N. Martino, N. E. Zaritzky, and M. V. E. Grossmann, “Constrained mixture design applied to the development of cassava starch–chitosan blown films,” *J. Food Eng.*, vol. 108, no. 2, pp. 262–267, 2012.
- [102] A. Bodea and S. E. Leucuta, “Optimization of hydrophilic matrix tablets using a D-optimal design,” *Int. J. Pharm.*, vol. 153, no. 2, pp. 247–255, 1997.
- [103] A. Kramar, S. Turk, and F. Vrečer, “Statistical optimisation of diclofenac sustained release pellets coated with polymethacrylic films,” *Int. J. Pharm.*, vol. 256, no. 1–2, pp. 43–52, 2003.
- [104] P. Campos Donoso, S. González Gómez, and N. Reyes Najle, “Bio plásticos utilizados en la agroindustria—aplicación en láminas para la germinación de la semilla del pimiento,” pp. 21-25, 2009.
- [105] R. Aliyazıcioglu, H. Sahin, O. Erturk, E. Ulusoy, and S. Kolayli, “Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 16, no. 2, pp. 277–287, 2013.
- [106] T. Farooqui and A. A. Farooqui, “Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases,” *Front Biosci (Elite Ed)*, vol. 4, pp. 779–793, 2012.

- [107] N. Sahinler and O. Kaftanoglu, "Natural product propolis: chemical composition," *Nat. Prod. Res.*, vol. 19, no. 2, pp. 183–188, 2005.
- [108] R. Socha, D. Gałkowska, M. Bugaj, and L. Juszczak, "Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland," *Nat. Prod. Res.*, vol. 29, no. 5, pp. 416–422, 2015.
- [109] B. Kędzia, "Chemical composition of Polish propolis. Part II. New studies," *Postępy Fitoter.*, pp.122-128, 2009.
- [110] D. Kolankaya, G. Selmanoğlu, K. Sorkun, and B. Salih, "Protective effects of Turkish propolis on alcohol-induced serum lipid changes and liver injury in male rats," *Food Chem.*, vol. 78, no. 2, pp. 213–217, 2002.
- [111] A. Hatano *et al.*, "Antioxidant activity and phenolic constituents of red propolis from Shandong, China," *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 18, no. 4, pp. 577–584, 2012.
- [112] E. Gregoris and R. Stevanato, "Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 48, no. 1, pp. 76–82, 2010.
- [113] Z. Ahangari, M. Naseri, and F. Vatandoost, "Propolis: chemical composition and its applications in endodontics," *Iran. Endod. J.*, vol. 13, no. 3, p. 285, 2018.
- [114] E. Middleton Jr and C. Kandaswami, "Potential health-promoting properties of citrus flavonoids," *Food Technol.*, vol. 48, no. 11, pp. 115–119, 1994.
- [115] E. Middleton, "Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function," *Flavonoids living Syst.*, pp. 175–182, 1998.
- [116] J. S. Bonvehí and A. L. Gutiérrez, "Antioxidant activity and total phenolics of propolis from the Basque Country (Northeastern Spain)," *J. Am. oil Chem. Soc.*, vol. 88, no. 9, pp. 1387–1395, 2011.
- [117] T. Mabry, K. R. Markham, and M. B. Thomas, *The systematic identification of flavonoids*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [118] T. Ozdal, F. D. Ceylan, N. Eroglu, M. Kaplan, E. O. Olgun, and E. Capanoglu, "Investigation of antioxidant capacity, bioaccessibility and LC-MS/MS phenolic profile

- of Turkish propolis,” *Food Res. Int.*, vol. 122, pp. 528–536, 2019.
- [119] N. Kalogeropoulos, S. J. Konteles, E. Troullidou, I. Mourtzinou, and V. T. Karathanos, “Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus,” *Food Chem.*, vol. 116, no. 2, pp. 452–461, 2009.
- [120] Y. Yuan, S. Zheng, L. Zeng, Z. Deng, B. Zhang, and H. Li, “The phenolic compounds, metabolites, and antioxidant activity of propolis extracted by ultrasound-assisted method,” *J. Food Sci.*, vol. 84, no. 12, pp. 3850–3865, 2019.
- [121] S. Kumazawa, T. Hamasaka, and T. Nakayama, “Antioxidant activity of propolis of various geographic origins,” *Food Chem.*, vol. 84, no. 3, pp. 329–339, 2004.
- [122] P. Calvo, T. Hernández, M. Lozano, and D. González-Gómez, “Microencapsulation of extra-virgin olive oil by spray-drying: Influence of wall material and olive quality,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 112, no. 8, pp. 852–858, 2010.
- [123] C. R. Ríos-Soberanis, V. M. Moo-Huchin, R. J. Estrada-Leon, and E. Perez-Pacheco, “Comparative Analysis between Corn and Ramon (*Brosimum alicastrum*) Starches to Be Used as Sustainable Bio-Based Plastics,” *Int. J. Chem. Mol. Eng.*, vol. 10, no. 2, pp. 211–214, 2016.
- [124] A. Bezazi, A. Belaadi, M. Bourchak, F. Scarpa, and K. Boba, “Novel extraction techniques, chemical and mechanical characterisation of *Agave americana* L. natural fibres,” *Compos. Part B Eng.*, vol. 66, pp. 194–203, 2014.
- [125] E. Agama-Acevedo, G. Pacheco-Vargas, L. A. Bello-Pérez, and J. Alvarez-Ramirez, “Effect of drying method and hydrothermal treatment of pregelatinized Hylon VII starch on resistant starch content,” *Food Hydrocoll.*, vol. 77, pp. 817–824, 2018.
- [126] W. Tongdeesoontorn, L. J. Mauer, S. Wongruong, P. Sriburi, and P. Rachtanapun, “Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films,” *Chem. Cent. J.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–8, 2011.
- [127] H. Chi, K. Xu, D. Xue, C. Song, W. Zhang, and P. Wang, “Synthesis of dodecanyl succinic anhydride (DDSA) corn starch,” *Food Res. Int.*, vol. 40, no. 2, pp. 232–238, 2007.
- [128] Y. Wang *et al.*, “Hydrogels with self-healing ability, excellent mechanical properties and

- biocompatibility prepared from oxidized gum arabic,” *Eur. Polym. J.*, vol. 117, pp. 363–371, 2019.
- [129] N. S. V Capanema, A. A. P. Mansur, A. C. de Jesus, S. M. Carvalho, L. C. de Oliveira, and H. S. Mansur, “Superabsorbent crosslinked carboxymethyl cellulose-PEG hydrogels for potential wound dressing applications,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 106, pp. 1218–1234, 2018.
- [130] S.-M. Hasheminya, R. R. Mokarram, B. Ghanbarzadeh, H. Hamishekar, H. S. Kafil, and J. Dehghannya, “Development and characterization of biocomposite films made from kefiran, carboxymethyl cellulose and Satureja Khuzestanica essential oil,” *Food Chem.*, vol. 289, pp. 443–452, 2019.