

Desarrollo y caracterización de películas de degradación oral enriquecidas con extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizado.

José Guillermo Cervera Torres

Director

Laura María Reyes Méndez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia

Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería

Ingeniería de Alimentos

2025

Desarrollo y caracterización de películas de degradación oral enriquecidas con extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizado.

José Guillermo Cervera Torres

Trabajo de grado modalidad investigación, presentado como requisito para optar por el título de
Ingeniero de Alimentos

Director

Laura María Reyes Méndez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Básicas, Tecnología e Ingeniería
Ingeniería de Alimentos

2025

Declaración de Derechos de Propiedad Intelectual

Los autores de la presente propuesta manifestamos que conocemos el contenido del Acuerdo 06 de 2008, Estatuto de Propiedad Intelectual de la UNAD, Artículo 39 referente a la cesión voluntaria y libre de los derechos de propiedad intelectual de los productos generados a partir de la presente propuesta. Asimismo, conocemos el contenido del Artículo 40 del mismo Acuerdo, relacionado con la autorización de uso del trabajo para fines de consulta y mención en los catálogos bibliográficos de la UNAD.

Agradecimientos

Estas líneas son para aquellas personas que han hecho parte de mi vida y que me han acompañado en el camino y muchas veces han sabido guiarme y apoyarme.

Aunque a mis padres les debo la vida, a mis abuelas Eslit y Leonor García les debo la crianza, gracias porque supieron cuidarme en la infancia e iniciarme en el camino de la ciencia de los alimentos, a don Carlos Vargas, que me enseñó las primeras letras y de quien aprendí el sentido de la superación a través del estudio y la lectura, mi tío Favio Vargas. Para todos ellos, aunque ahora ya no me acompañan en esta vida, mi más profunda gratitud, cariño y respeto.

A mi madre, gracias por su esfuerzo y su cariño, hoy disfruto mucho escuchar sus palabras y ver la sabiduría que hay en ellas.

A mi padre y hermanos de quien he aprendido que hay que perseverar, que las dificultades se presentan para darnos la oportunidad de aprender y hacernos fuertes.

Una línea muy especial para Armando José Rizo, quien me permitió tener un proyecto de vida, crecer, crear, caer y levantarme, mi Doctor Armandito, gracias por su apoyo, comprensión y generosidad, doy gracias al G.A.U. como diría usted en algún momento por tenerlo en mi camino. Gracias por trascender mi vida, nada de esto sería posible sin su ayuda.

A la profesora Alba Doris por su tiempo y amistad por animarme a terminar este proceso.

A la profesora Paula Andrea Méndez por la oportunidad de participar en este proyecto de investigación, por su apoyo guía, tiempo y dedicación que hoy me permiten presentar este trabajo de grado.

A mi directora de tesis, profesora Laura María Reyes, que de manera muy especial me ha brindado no solo su apoyo, sino que desde que llegué nuevamente a la UNAD, me ha guiado,

acompañado y aconsejado. Reconozco en ella un gran ejemplo de vocación de estudio y conocimiento que me comprometen a hacer siempre mi mejor esfuerzo.

A mi esposa Damaris Iriarte Gómez quien, a lo largo de estos años, me ha brindado su cariño, paciencia, apoyo, comprensión, sin ella este camino no tendría posibilidades o sentido alguno. A

mis dos hijas Laura y Leidy que han sido motor de nuestro hogar y motivo de orgullo para nuestra familia y por supuesto, a mi nieta Helena que es sinónimo de alegría, cariño y esperanza.

A mi Nenita, por su fe, fortaleza y sus oraciones diarias, a mi tío Carlitos y a todas aquellas personas que de una manera u otra han formado parte de mi vida.

*La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero ...
¡Que importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener
confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para
realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla,
cueste lo que cueste.*

Marie Curie.

Resumen

El fruto del totumo (*Crescentia cujete*) ha sido utilizado ancestralmente para tratar resfriados y en la elaboración de artesanías, también, se han realizado estudios para determinar si sus pigmentos pueden ser utilizados en la industria textil, como alimento animal mediante el ensilado e incluso se ha elaborado mermelada a partir de su pulpa; de igual manera, se han analizado algunos principios activos del pericarpio, logrando identificar fenoles y flavonoides. En el contexto de nuevos conceptos relacionados con la economía circular, la revaloración de materias primas disponibles en nuestro entorno y la pertinencia de la territorialidad hacen que el objetivo del proyecto sea la generación nuevo conocimiento y uso de este recurso, con el fin de dar valor agregado al totumo mediante la extracción, liofilización, caracterización y adición de principios activos en una matriz polimérica de degradación oral desarrollados a partir de macromoléculas como gelatina y carboximetil celulosa (CMC) utilizando sorbitol como plastificante bajo la técnica de *Solvent Casting*, generando películas de fácil suministro entre niños y personas de la tercera edad que puedan tener problemas de deglución. La caracterización de los extractos y la matriz biopolimérica se realizó en función de su actividad antimicrobiana, presencia de fenoles y flavonoides totales, su capacidad antioxidante, microestructura y desintegración. El estudio demostró un mayor el contenido de fenoles totales en la pulpa verde sometida a liofilización y método de extracción Soxhlet con niveles de $4,7 \pm 0,4$ mg GAE /g; $0,14 \pm 0,013$ mg QE/g en el caso de flavonoides totales y capacidad antioxidante de $188,9 \pm 0,405$ EC₅₀. El extracto Verde-Fresco-Ultrasonido (VFU), presentó halos de inhibición antimicrobiana con valores de $8,83 \pm 1,18$ mm frente a *S. mutans*, mientras que el extracto Verde-Liofilizado- Soxhlet (VLS) presentó valores de $7,83 \pm 2,72$ y $10,83 \pm 2,59$ frente a *S. mutans* y *E. coli* respectivamente. Todas las películas funcionalizadas con extracto VLS en

concentraciones de 4,5,6 y 7% mostraron halos de inhibición entre 4,6 y 5 cm de diámetro respecto a discos de 2,5 cm de diámetro, siendo la película adicionada con extracto VLS al 6% la que presentó mayor inhibición con un halo de 5 cm frente a *S. mutans*. Las películas funcionalizadas con extracto de totumo VLS no mostraron actividad inhibitoria frente al *E. coli*.

Palabras clave: biopolímero, fenoles, flavonoides, antimicrobiano, antioxidante.

Abstract

The fruit of the totumo (*Crescentia cujete*) has been used ancestrally to treat colds and in the production of handicrafts. Also, studies have been carried out to determine if its pigments can be used in the textile industry, as animal feed through silage and even jam has been made from its pulp. Likewise, some active principles of the pericarp have been analyzed, managing to identify phenols and flavonoids. In the context of new concepts related to the circular economy, the revaluation of raw materials available in our environment and the relevance of territoriality make the object of the project the generation of new knowledge and use of this resource, in order to give added value to the totumo through the extraction, lyophilization, characterization and addition of active ingredients found in an orally degradable polymeric matrix developed from macromolecules such as gelatin and carboxymethyl cellulose (CMC) using sorbitol as a plasticizer under the *Solvent Casting* technique, generating films that are easy to supply among children and elderly people who may have swallowing problems. The characterization of the extracts and the biopolymeric matrix was carried out based on their antimicrobial activity, presence of total phenols and flavonoids, their antioxidant capacity, microstructure and disintegration. The study demonstrated a higher content of total phenols in the green pulp subjected to freeze-drying and Soxhlet extraction method with levels of 4.7 ± 0.4 mg GAE /g; 0.14 ± 0.013 mg QE/g in the case of total flavonoids and antioxidant capacity of 188.9 ± 0.405 EC₅₀. The VFU extract showed halos of antimicrobial inhibition with values of 8.83 ± 1.18 mm against *S. mutans*, while the Green-Lyophilized-Soxhlet extract presented values of 7.83 ± 2.72 and 10.83 ± 2.59 against *S. mutans* and *E. coli* respectively. All films functionalized with VLS extract at concentrations of 4,5,6 and 7% showed inhibition zones between 4.6 and 5 cm in diameter with respect to 2.5 cm diameter discs, with the film added with VLS extract to the 6%

showed greater inhibition with a 5 cm halo against *S. mutans*. The films functionalized with totumo VLS extract did not show inhibitory activity against *E. coli*.

Keywords: biopolymer, phenols, flavonoids, anti-microbial, antioxidant.

Tabla de Contenido

Resumen.....	7
Abstract.....	9
Introducción	18
Planteamiento del Problema	20
Justificación	22
Objetivos.....	26
Objetivo General.....	26
Objetivos Específicos.....	26
Marco Conceptual y Teórico	27
Descripción del Totumo (Crescentia cujete L.) y Usos Tradicionales	27
Principios Activos o Metabolitos Secundarios de Interés.....	28
Compuestos Químicos Presentes en el Fruto del Totumo (Crescentia cujete L.).....	30
Macromoléculas y Plastificantes Utilizados en Películas de Degradación Oral.....	32
Carboximetil Celulosa Sódica (CMC)	34
Sorbitol.....	37
Etanol	39
Métodos de Extracción	39
Metodología	41
Obtención de Pulpa y Extractos	41
Liofilización.....	41
Extracción por Agitación	41

	12
Extracción por Ultrasonido.....	42
Extracción por Soxhlet.....	42
Caracterización de Extractos.....	43
Contenido de Fenoles Totales.....	43
Contenido de Flavonoides Totales.....	44
Determinación de la Capacidad Antioxidante por Captura del Radical Libre DPPH*	45
Actividad Antimicrobiana.....	45
Análisis en el Infrarrojo (FTIR).....	46
Elaboración y Caracterización de Películas de Degradación Oral.....	46
Elaboración de Películas.....	46
Espesor de las Películas	46
Color y Barrera a la Luz de Películas	47
Tiempo de Desintegración en Películas	47
Solubilidad de las Películas	47
Humedad de las Películas	47
Actividad Antimicrobiana en Películas	47
Fenoles Totales en Películas	48
Liberación in Vitro en Películas	48
Perfil de Liberación en Películas	49
Análisis en el Infrarrojo (FTIR) de Películas.....	49
Análisis Estadístico.....	49
Resultados y Discusión.....	50
Obtención de Pulpa y Extractos de Totumo (Crescentia cujete L).....	50

Liofilización.....	50
Contenido de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos de Totumo	51
Determinación de Capacidad Antioxidante por Captura del Radical Libre DPPH•.....	54
Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Totumo.....	55
Análisis en el Infrarrojo (FTIR) de los Extractos	59
Caracterización de Películas de Degradación Oral.....	63
Espesor de las Películas de Degradación Oral	63
Color y Barrera a la Luz.....	64
Tiempo de Desintegración	66
Contenido de Humedad y Solubilidad de las Películas de Degradación Oral	68
Análisis en el Infrarrojo (FTIR) de las Películas de Degradación Oral	70
Actividad Antimicrobiana.....	74
Contenido de Fenoles Totales de las Películas de Degradación Oral.....	77
Liberación In Vitro de Películas de Degradación Oral.....	77
Cinética de Liberación en Películas de Degradación Oral.....	79
Conclusiones	82
Recomendaciones	85
Referencias bibliográficas.....	86

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Perdida de humedad de pulpa de totumo sometido a liofilización</i>	51
Tabla 2 <i>Relación e identificación de extractos obtenidos</i>	51
Tabla 3 <i>Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de totumo según tratamientos aplicados</i>	52
Tabla 4 <i>Resultados capacidad antioxidante frente a radical DPPH'</i>	54
Tabla 5 <i>Resultados halos de inhibición de extractos de totumo</i>	57
Tabla 6 <i>Identificación de las principales señales características de los espectros de extractos de totumo VFA; VFL; VFU; VLU; VFS; VLS.</i>	62
Tabla 7 <i>Espesor de películas con adición de diferentes porcentajes de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet</i>	63
Tabla 8 <i>Tiempo de desintegración de películas según formulación</i>	67
Tabla 9 <i>Tiempo de desintegración en función del grosor de las películas</i>	68
Tabla 10 <i>Contenido de humedad de las biopelículas</i>	69
Tabla 11 <i>Porcentaje de solubilidad biopelículas</i>	69
Tabla 12 <i>Principales señales de espectros FTIR de películas F1 0% VLS; F2 4% VLS; F3 5% VLS; F4 6% VLS; F5 7% VLS</i>	73
Tabla 13 <i>Fenoles totales presentes en biopelículas adicionadas con extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet en diferentes concentraciones</i>	77
Tabla 14 <i>Cinética de liberación de fenoles</i>	79

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Estructura química de la carboximetil celulosa</i>	34
Figura 2 <i>Representación estructura química de la gelatina</i>	36
Figura 3 <i>Estructura molecular del sorbitol</i>	38
Figura 4 <i>Estructura molecular del etanol</i>	39
Figura 5 <i>Proceso de obtención de extractos</i>	50
Figura 6 <i>Actividad antimicrobiana de extractos de totumo</i>	56
Figura 7 <i>Gráfica FTIR de extractos de totumo. Rango 4000-1500 cm^{-1}</i>	60
Figura 8 <i>Gráfica FTIR de extractos de totumo. Rango 1500-400 cm^{-1}</i>	61
Figura 9 <i>Aspecto visual de Películas de CMC y Gelatina con diferentes porcentajes de extracto de totumo</i>	64
Figura 10 <i>Barrera a la luz UV-visible de películas funcionalizadas con extracto de totumo a diferentes porcentajes</i>	65
Figura 11 <i>Prueba de desintegración</i>	67
Figura 12 <i>Espectros FTIR del extracto de totumo VLS y las películas funcionalizadas con las principales señales características</i>	71
Figura 13 <i>Espectros FTIR del extracto de totumo VLS y las películas funcionalizadas con las principales señales características en el rango 1500 a 400 cm^{-1}</i>	72
Figura 14 <i>Halos de inhibición películas funcionalizadas frente a E. coli</i>	74
Figura 15 <i>Halos de inhibición películas funcionalizadas frente a S. mutans</i>	75
Figura 16 <i>Perfil de liberación fenoles en películas F4 y F5</i>	78

Lista de Símbolos y Abreviaturas

%	Porcentaje
±	Más o menos
°C	Grado centígrado
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ANOVA	Análisis de Varianza
ATCC:	American Type Culture Collection
ATR	Atenuador de Reflectancia Total
CAS	Número de registro único Chemical Abstracts Service
CCAgNP	Nanopartículas de plata y Cesentia cujete
CCAuNP	Nanopartículas de oro y Crescentia cujete
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
CMC	Carboximetil celulosa
DPPH•	Radical (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
DS	Desviación estándar
E.T.	Extracto de totumo
EC50	Concentración efectiva 50%
EIA	Escuela de Ingeniería de Antioquia
EUA	Extracción asistida por ultrasonido
F	Formulacion 1,2,3,4,5
FOD	Películas orodegradables
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
g	Gramo
GAE	Equivalentes de ácido gálico
GNPS	Global Natual Products Social molecular Networking
h	Hora
HCN	Ácido Clorhidrico
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos
K	Constante de difusión
L1	Nivel 1 de confirmación de estructura
L2	Nivel 2 de confirmación de estructura
L3	Nivel 3 de confirmación de estructura
LIDA	Laboratorio de Investigación y Desarrollo Agroalimentario
LPS	Lipopolisacáridos
MFA	Maduro-Fresco-Agitación
MFS	Maduro-Fresco-Soxhlet
MFU	Maduro-Fresco-Ultrasonido
Mg	Miligramo
ml	Mililitro
MLA	Maduro-Liofilizado-Agitación

MLS	Maduro-Liofilizado-Soxhlet
MLU	Maduro-Liofilizado-Ultrasonido
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
Mpa	Megapascal
MTCC:	Microbial Type Culture Collection, Government of India.
n	Valor de exponente modelo Korsmeyer-Pepas
Nm	Nanómetro
OMS	Organización Mundial para la Salud
PEG	Polietilenglicol
QE	Equivalente Quercetina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
Rpm	Revoluciones por minuto
Tg	Temperatura de transición vítrea
UNAD	Universidad Nacional Abierta a Distancia
UPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de ultra rendimiento y espectrometría de masas
UV-vis	Espectrometría ultravioleta visible
VFA	Verde-Fresco-Agitación
VFS	Verde-Fresco-Soxhlet
VFU	Verde-Fresco-Ultrasonido
VLA	Verde-Liofilizado-Agitación
VLS	Verde-Liofilizado-Soxhlet
VLU	Verde-Liofilizado-Ultrasonido

Introducción

Inspirados en el conocimiento ancestral del uso de productos naturales para llevar salud y bienestar al pueblo y con el ánimo de contribuir al desarrollo de economías territoriales basadas en el uso y revalorización de los recursos disponibles, entre ellos el fruto del totumo (*Crescentia Cujete* L.), el presente trabajo de investigación, tuvo por objetivo el desarrollo y caracterización de películas de degradación oral enriquecidas con extracto de totumo con la intencionalidad de ser utilizadas en personas con limitaciones para la deglución como los niños y personas de la tercera edad.

Para este estudio, se estableció una investigación desde un enfoque cuantitativo descriptivo, las variables independientes consideradas fueron: madurez del fruto, (maduro/verde); estado de la pulpa (Fresca/liofilizada); método de extracción (agitación, Soxhlet y ultrasonido) y tres replicas por cada experimento, mientras que las variables dependientes corresponden a los resultados cuantitativos obtenidos. Para el logro del objetivo principal se propuso el desarrollo en tres fases: primero la obtención de extractos a partir de pulpa fresca y liofilizada del totumo y posteriormente sometida a extracción con etanol al 96% mediante métodos de agitación, soxhlet y ultrasonido; en una segunda fase, se realizó la caracterización de los extractos mediante cuantificación de fenoles y flavonoides totales, capacidad antioxidante utilizando como marcador el radical DPPH[•]; identificación de principales señales de grupos funcionales mediante FTIR y actividad antimicrobiana frente a cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175; finalmente se formularon las películas utilizando gelatina y carboximetil celulosa como macromoléculas y sorbitol como plastificante, que se funcionalizaron con extractos de fruto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet (VLS) que presentaron mejores resultados en la segunda fase y realizando

pruebas de caracterización como barrera a la luz mediante determinación en espectrofotómetro UV-Visible, espesor de las películas, contenido de humedad, solubilidad, desintegración, Fenoles totales y tiempo de liberación; se analizó en infrarrojo mediante equipo FTIR y actividad antimicrobiana por difusión en disco.

Los resultados se compararon con los obtenidos por otros estudios publicados en la literatura, permitiendo establecer similitudes y diferencias adquiriendo nuevo conocimiento que podrá ser utilizado en futuras investigaciones.

Planteamiento del Problema

Colombia es el tercer país con más biodiversidad después de Brasil e Indonesia y el segundo en relación a palmas y plantas en general, el totumo (*Crescentia cujete L.*) es una especie arbórea que crece en las tierras cálidas y tropicales de sur América y ha sido estudiado y caracterizada a distintos niveles por académicos encontrando en esta especie potencialidad para ser utilizada en artesanías y como producto forrajero por su alto contenido proteico (Insuasty-Santacruz et al, 2013); ha sido utilizado en la medicina tradicional como es el caso de la infusión de sus hojas para tratar la hipertensión, la pulpa del fruto que se utiliza para tratar la diarrea, el dolor de estómago, los resfriados, la bronquitis, la tos, el asma y la uretritis (Trading, 2017); En Indonesia, los extractos del árbol de *Crescentia Cujete L.* conocido como Majapahit ha sido estudiado tanto *in vitro* como *in silico* como antibacteriano contra el *Vibro harveyi* en camarones vannamei (Rahmaningsih et al, 2019), otros estudios han mencionado actividad antifatiga y antinociceptiva (alteración de aspectos sensoriales de la intensidad del dolor) (Gonzalez 2023), No obstante, esta potencialidad y conocimiento ancestral no ha sido suficientemente estudiado y explorado de manera científica utilizando métodos de extracción y liofilización de los compuestos activos de la pulpa del fruto, que tienen posibilidad de ser incorporados como fitoconstituyentes en películas de degradación oral (FODs) susceptibles de gran aceptación en el mercado debido a ventajas como la fácil administración ya que no requieren agua para su ingesta y pueden ser utilizadas por personas con dificultad o limitaciones en la deglución como es el caso de infantes o personas de la tercera edad debido a su rápida desintegración permitiendo una rápida absorción de los bioactivos en las membranas bucales.

En virtud de lo anterior, se plantea las siguientes preguntas de investigación:

¿De qué manera, la incorporación del extracto de la pulpa del fruto de totumo (*Crescentia cujete L.*) liofilizado, en una matriz polimérica, puede ser una alternativa potencialmente viable para el desarrollo de películas de degradación oral con actividad biológica?

¿La incorporación de extracto liofilizado de la pulpa del fruto de totumo (*Crescentia cujete L.*) en una matriz polimérica, puede presentarse como una alternativa potencialmente viable para el desarrollo de películas de degradación oral con actividad biológica?

Justificación

En el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), se hace necesario generar valor agregado a los recursos naturales disponibles en los territorios propiciando la innovación y sostenibilidad a partir de acciones investigativas como la generación de conocimiento y el aprovechamiento de recursos naturales mediante el desarrollo de nuevos productos funcionales que lleven bienestar social, económico y sanitario a las comunidades. El fruto de Totumo ha mostrado potencial en la medicina tradicional, donde su uso en el tratamiento de resfriados y afectaciones respiratorias tiene larga data. El estudio de sus propiedades fisicoquímicas y generación de valor a través de la incorporación de los extractos en materiales biopoliméricos, permitiría un avance exploratorio de la formulación de nuevos productos y un aporte al desarrollo social y territorial, a la construcción de un país más productivo, que mejore la calidad de vida de los colombianos en el marco de la "Innovación y Tejido Social para el Desarrollo del Territorio", eslogan de la convocatoria de proyectos de investigación de la UNAD para el año 2022 como propuesta de aporte directo a los Objetivos de Desarrollo Sostenible - numerales 9 (Industria, innovación e infraestructura), 10 (Reducción de las desigualdades) y 11 (Ciudades y comunidades sostenibles).

La incorporación de extractos de partes habitualmente no utilizadas de frutos en matrices biopoliméricas, usadas como vehículo de compuestos activos puede ser una alternativa viable para el aprovechamiento de sustancias antioxidantes y antimicrobianas, además de constituir una nueva manera de administración que contribuya al mecanismo de defensa primario de prevención de lesiones oxidativas interceptando radicales libres antes que puedan generar daño celular (Josiane Gonçalves Borges, 2017; Goszcz et al., 2015).

La administración de compuestos activos mediante películas de degradación oral, presenta diversas ventajas como evitar el paso por el tracto intestinal donde son metabolizadas, la facilidad de manipulación y transporte, así como su fácil administración, ya que no necesitan agua para su solubilización y pueden ser usadas por personas con dificultad de deglución; además, por ser más delgadas y flexibles comparadas con tabletas y pastillas, presentar mayor aceptación por parte de los consumidores (Josiane Gonçalves Borges, 2017; Patel, Liu, & Brown, 2011). Por otra parte, las películas al no ser degradadas por el tracto gastrointestinal ni por el metabolismo hepático, éstas pueden contener concentraciones menores de compuesto activo (Dixit & Puthli, 2009).

En el contexto de la medicina tradicional, cabe citar una publicación de la Organización Mundial para la Salud (OMS, 2023), donde, “Según datos de 2012, casi la mitad de la población en muchos países industrializados utiliza actualmente alguna forma de medicina tradicional y complementaria de forma regular (Estados Unidos, 42%; Australia, 48%; Francia, 49%, y Canadá, 70%); y en muchos otros países también se hace un uso importante de alguna de sus modalidades (Chile, 71%; Colombia, 40%, y hasta un 80% en algunos países africanos)”. Esta organización considera que la medicina tradicional integrada adecuadamente a los sistemas de salud puede ayudar a mejorar la disponibilidad de servicios, sobre todo en atención primaria. Su uso debe basarse en pruebas científicas que soporten y argumentan su validez y seguridad para evitar daños a los pacientes y ofrecer una complementariedad que lleve al bienestar de la población aplicando conocimiento científico y tradicional, según la declaración de Astana (2018). Por otro lado, en el contexto nacional, la sala especializada de productos fito-terapéuticos y suplementos dietarios de la comisión revisora del INVIMA ha incluido el fruto del Totumo (*Crescentia Cujete L.*) en el listado de plantas medicinales como coadyuvante en el manejo de

trastornos respiratorios leves. Adicionalmente se trae como complemento justificativo el concepto de sustancia activa a la luz del decreto 1156 de 2018 que los define como: “los ingredientes de los productos fitoterapéuticos que tienen actividad terapéutica. En el caso de productos fitoterapéuticos cuyas sustancias activas hayan sido identificadas, se debe normalizar su preparación a través de extractos estandarizados, indicando: solvente, método de extracción y marcadores a cuantificar, para lo cual se debe disponer de métodos analíticos adecuados que los cuantifiquen. En los casos en que no se puedan identificar las sustancias activas, se puede considerar que todo el material de la planta medicinal, parte de esta o su preparación constituye la sustancia activa.”

Con base en esta perspectiva, la incorporación de extractos vegetales con propiedades biológicas en películas de degradación oral podría ser una forma de fijar dosificaciones adecuadas y conocidas de estas sustancias, proporcionar una nueva forma de administración, de principios activos obtenidos de infusiones y extractos, minimizar el uso de drogas sintéticas y sus efectos colaterales, así como la generación de valor agregado a los recursos naturales incentivando la participación de las comunidades.

El fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) se encuentra entre los más utilizados en medicina tradicional para síntomas de los resfriados, como expectorante y en el tratamiento de bronquitis, dado sus propiedades antimicrobianas, anti-inflamatorias, también ha sido utilizado como acaricida, aunque de manera científica poco se ha estudiado sus propiedades fisicoquímicas a profundidad (Espitia-Baena, Duran-Sandoval, Fandiño-Franky, Díaz- Castillo, & Gómez-Estrada, 201; Espitia-Baena et al., 2011; Pereira, de Araújo, Guilhon, Santos, & Junior, 2017; De, Ortiz, & Chilpa, 2016).

En virtud de las posibles ventajas que puede ofrecer el fruto del totumo y las películas de degradación oral, se plantea como objetivo, el desarrollo de películas de degradación oral enriquecidas con extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizado.

Objetivos

Objetivo General

Desarrollar películas de degradación oral enriquecidas con extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizado con potencial actividad biológica.

Objetivos Específicos

Indicar los extractos del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizados que presenten mayor contenido fenoles totales, flavonoides totales; capacidad antioxidante frente al radical DPPH[•] y actividad antimicrobiana contra las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Establecer las formulaciones de películas de degradación oral a base de gelatina y carboximetil celulosa (CMC), enriquecidas con extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) que presenten la mayor capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana.

Determinar las características físicas de las películas de degradación oral producidas, así como el tiempo de desintegración oral in vitro y el perfil de liberación de los compuestos fenólicos, bajo condiciones simuladas de la cavidad oral.

Marco Conceptual y Teórico

El desarrollo de películas de degradación oral enriquecidas con extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizado con potencial actividad biológica se fundamenta inicialmente en el conocimiento ancestral sobre los beneficios de este recurso natural para el tratamiento de afecciones respiratorias, digestivas y de la piel entre otros, dando origen a diversos estudios científicos alrededor de principios activos identificados como es el caso de fenoles y flavonoides que son metabolitos secundarios derivados del ácido cinámico y benzoico. Por otro lado, el uso de macromoléculas para la producción de películas biopoliméricas bucodispersables y de grado alimenticio elaboradas mediante la técnica *Solvent Casting* constituyen el punto de partida del presente estudio de investigación cuyo fin es la elaboración de películas de degradación oral enriquecidas con los principios activos del fruto del totumo (*Crescentia cujete* L.) previamente caracterizados, logrando un producto flexible y de rápida degradación en boca sin necesidad de agua para su ingesta permitiendo la rápida liberación y absorción a través de las membranas y capilares sin necesidad de ser asimilados a nivel gástrico, lo cual supone evitar la transformación metabólica en el hígado. Este método de liberación ha sido utilizado anteriormente para la administración de fármacos por vía oral, en la producción de apósitos para tratar heridas y en el uso de láminas para refrescar el aliento entre otras aplicaciones.

Descripción del Totumo (*Crescentia cujete* L.) y Usos Tradicionales

De acuerdo con el catálogo virtual de flora del Valle del Aburrá de la universidad EIA, el totumo (*Crescentia Cujete* L.), etimológicamente, debe su nombre científico “*Crescentia*” por Pietro de Crescenzi jurista italiano (1230/1320) que escribió un tratado agrícola que a la postre se convirtió en el primer texto sobre agricultura moderna debido a la forma en que estructuró su escrito; “*cujete*” por su nombre nativo, originaria de América tropical, cuya madera tiene usos

ornamentales y su fruto para artesanías. Aunque también se ha reportado su presencia en África, Malacia e India. El fruto silvestre puede ser redondo u ovoide, su pulpa se usa como expectorantes, anti-inflamatorio, laxante, purgante, calmantes de dolores menstruales, jarabes y su corteza para elaborar artesanías, cantimploras, cucharas, totumas, vasijas (Murgueitio y Ibrahim 2004).

En Colombia el mayor uso dado a este fruto ha sido el desarrollo de artesanías y como alimento para bovinos en épocas de sequía (Flórez, 2012). Pertenece a la familia de las bignoniáceas, su altura oscila entre 4 y 6 metros, conocida como calabazo, mate o jícaro entre otros. Presenta hojas simples, alternas y carentes de pecíolo en su unión al tallo, organizadas de forma helicoidal y curvadas; flores grandes, caulinares (que nacen directamente del tallo) y pétalos campanulares y color verde y su fruto en baya igualmente de color verde (Cárdenas et al., 2004). En Centroamérica se registran el uso culinario de la semilla que se extrae del fruto para la preparación de una bebida llamada horchata o morro (Chizmar, 2009).

Otros sinónimos son: *Crescentia acuminata*, *Crescentia arborea Rafinesque*, *Crescentia cuneifolia Garder*, *Crescentia angustifolia* (Missouri Botanical Garden, 2007).

Principios Activos o Metabolitos Secundarios de Interés

Son aquellas moléculas o productos del metabolismo vegetal que poseen actividad biológica o de interés farmacéutico con potencialidad terapéutica o fito-terapéutica.

Los fenoles son metabolitos secundarios de las plantas, es decir no intervienen en las funciones vitales. Químicamente son estructuras moleculares que tienen uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a un anillo aromático fisiológicamente denominándose en este caso mono, di o tri-fenoles, pudiendo estar conjugados o unidos a otras moléculas formando esterres o glucósidos. En la planta, los fenoles cumplen funciones de protección, son responsables de la

formación de aromas, color, sabor, amargor y astringencia, además tienen propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, estos compuestos fenólicos tienen una actividad biológica importante, como los antibióticos, antiparasitarios y citotóxicos.

Los flavonoides son un tipo particular de los polifenoles presentes en plantas, siendo responsables del color de las flores y frutas; su estructura química consta de tres anillos: benzopirano 2-fenil, un anillo dihidroxilados fenólicos en las posiciones 5 y 7, (denotado A), un segundo anillo fenólico generalmente mono-hidroxilado, orto-dihidroxilados o vic-trihidroxilados (que se denota B), que también pueden contener grupos metoxi (O-CH_3) como sustituyentes y el anillo C, que puede ser un anillo heterocíclico con oxígeno pirano, pirylium o de forma pirona (Vermerris y Nicholson, 2008). Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos. (Martínez-Flórez et al., 2002).

Los terpenos iridóides son un amplio y creciente grupo de productos naturales aislados y caracterizados de plantas utilizadas en la medicina tradicional para una gran cantidad de enfermedades, entre las que destacan la tos, fiebre, hipertensión, dolor, inflamación y desórdenes de la piel (Ríos 2015).

Las saponinas son compuestos orgánicos naturales que tienen al menos un enlace glicosídico (enlace CO-azúcar) en C-3 entre aglicona y una cadena de azúcar, son empleadas como detergente, insecticida o fertilizante, a nivel alimenticio, se provechan sus propiedades emulsionantes y ambientalmente como limpiador de aguas residuales (El Aziz et al., 2019).

Los alcaloides designan sustancias naturales que reaccionan como los álcalis. Considerando su estructura molecular y ruta biosintética, los alcaloides se dividen en tres grupos: los alcaloides verdaderos, que derivan de aminoácidos y siempre tienen un nitrógeno intracíclico;

los proto alcaloides que son aminas simples y su nitrógeno es extracíclico; y los pseudo alcaloides que, aunque cumplen con las características de los alcaloides verdaderos, no derivan de aminoácidos.

Compuestos Químicos Presentes en el Fruto del Totumo (*Crescentia cujete* L.)

La extracción de compuestos activos de la pulpa del fruto y las hojas, no ha sido ampliamente explorado, aunque se sabe que contiene iridoides y glucósidos iridoides, fenoles, taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides entre otros compuestos, que han sido utilizados para tratar infecciones, bactericidas, antimicrobiano, analgésico y se sugiere puede actuar como antioxidante, antiinflamatorio, pero también como espumante y emulsionante (Ejelonu, Lasisi, Olaremu, & Ejelonu, 2011; Kaneko, Ohtani, Kasai, Yamasaki, & Nguyen Minh, 1998), los iridoides mejoran la actividad hepática y promueven la secreción biliar, (Ma, D., Aleixandre De Artiñano, A., Carreras, L., Miguel, ;, & Aleixandre, ; (2012); también se han aislado hongos endófitos que mostraron capacidad antibacteriana y antirradicalaria, adicionalmente los metabolitos obtenidos exhibieron efectos antiproliferativos contra células del carcinoma hepatocelular mediado por apoptosis (Prabukumar, Rajkuberan, Ravindran, & Sivaramakrishnan, 2015).

De acuerdo con estudios realizados por Flórez (2012), la pulpa ensilada en estado de maduración verde con 4 meses de maduración fisiológica sin ensilado, estrujada y sin secado presentó concentraciones de 11 ppm de Ácido cianhídrico (HCN), mientras que la pulpa en estado maduro con 6 meses de maduración fisiológica, sin ensilado, estrujada y sin secado presentó concentraciones de 4 ppm.

Estudios realizados Insuasty-Santacruz (2013) en el valle del Patía, reporta en el fruto del totumo (*Crescentia cujete* L.), bajos contenidos de saponinas, moderado contenido de taninos, abundante contenido de esteroides y ningún contenido de alcaloides.

Espitia-Baena, et al. (2011), identificó la presencia de tres grupos de metabolitos secundarios: flavonoides, esteroides y triterpenos en el epicarpio del fruto del totumo, arrojando gran contenido de estos compuestos, mientras que otros grupos de metabolitos como alcaloides, glicósidos cardiotónicos, naftoquinonas, iridoides, antraquinonas, saponinas y taninos, no fueron detectados en el estudio, aunque estos mismos sean biológicamente activos y comunes en otros órganos de la planta o en otras especies de pertenecientes a las bignoniáceas.

Ejelonu BC, et al., (2011) en el estado de Ondo, Nigeria, separó las semillas y analizó la pulpa del fruto maduro. Se evaluó cualitativamente la presencia de taninos, fenol, cardenólidos (derivados esteroides) y antraquinona alcaloides, flavonoides y saponinas obteniendo concentraciones de 0,11 ppm, superando el nivel de cianuro de la OMS para el agua potable (0,01 mg/L), implicando que el consumo continuo de extracto de pulpa de fruta puede eventualmente conducir a la toxicidad por cianuro de hidrógeno.

Rivera-Mondragón et al., (2020) hace una descripción fitoquímica de la pulpa del fruto del totumo *Crescentia cujete* L recolectada en Panamá mediante el uso de un enfoque metabolómico (huellas químicas únicas derivadas de los procesos celulares) combinando redes moleculares basadas en UPLC-MS/MS (cromatografía líquida de ultra rendimiento y espectrometría de masas) generadas en el sitio web de GNPS, con métodos convencionales, métodos de aislamiento y Resonancia Magnética Nuclear (RMN), caracterizando la composición química de *Crescentia cujete* L. según los niveles de confirmación propuestos por Schymanski et al. (2014), es decir nivel 1 (L1): para estructuras confirmadas por estándar de referencia o elucidación de estructura mediante espectroscopía de RMN; nivel 2a (L2a): para estructuras probables por coincidencia de espectro de biblioteca; y nivel 3 (L3): para candidatos tentativos basados en datos experimentales de espectrometría de masa. De manera confirmada el estudio

indica la presencia de n-alquil-glucósidos, glicósidos iridoideos como la aucubina, ajugol y crescentiol A y B; derivados feniletanoides como acteosidos; flavonoides como luteolina, que tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antibacteriales, antivirales y antitumorales; naringenina que tiene potencialidades como antiinflamatorio, antioxidante y vasodilatador entre otros; derivados de benzóilo e hidroxibenzóilo como el ácido 4-hidroxibenzoico y 3,4-dihidroxibenzoico; derivados cinamoilo e hidroxicinamoilo como el siribioside A y el ácido transcinámico.

Macromoléculas y Plastificantes Utilizados en Películas de Degradación Oral

Películas y recubrimientos basados en polímeros naturales y biodegradables se han desarrollado empleando polisacáridos y proteínas debido a que son renovables y capaces de formar matrices o películas, para ello se utilizan mezclas físicas de diferentes biocompuestos que permite obtener nuevos materiales con características adecuadas y superiores a las que exhiben los componentes puros al ser utilizados de manera individual. La principal ventaja de las mezclas es la simplicidad de preparación y el fácil control de propiedades físicas con concentraciones cambiantes de componentes (Barbosa y Peruch. 2019)

Por otro lado, las películas bucodispersables o de degradación oral, se caracterizan por estar elaboradas a partir de biopolímeros que forman estructuras laminares flexibles, que permiten superar barreras de deglución asociadas con la dosificación en tabletas o capsulas (Tescarollo et al., 2019); para su producción, se utilizan diferentes macromoléculas como la carboximetil celulosa (CMC), la gelatina, almidones, polietilenglicol entre otros y plastificantes como el sorbitol o la glicerina.

Una técnica utilizada para la realización de estas películas se denomina *Solvent Casting*, proceso mediante el cual, los polímeros utilizados en la formulación se mezclan en un solvente

para dar orientación a las moléculas, posteriormente se evapora el solvente, quedando una película (Resta y Mali, 2019; Deng et al., 2018).

Varias empresas farmacéuticas han desarrollado películas de degradación oral, empleando biopolímeros de grado alimenticio, como, por ejemplo, la farmacéutica Pfizer que desarrolló "Listerine® pocket packs™" para su uso como refrescante bucal (Bala et al., 2013). Otras películas con diferente funcionalidad han sido desarrolladas con principios activos como nicotina, caso de Niquitin Strips® parches transdérmicos para personas que sufrían ansiedad a causa de la nicotina, o el (Setofilm®), que es una película bucodispersable que se utiliza para tratar y prevenir las náuseas y vómitos causados por la quimio o radioterapia.

Además de los desarrollos realizados por las diferentes farmacéuticas, que han utilizado clorhexidina, flúor o triclosán, en enjuagues bucales medicados, otros investigadores se han enfocado en la elaboración de películas de degradación oral con base en macromoléculas como la gelatina, la CMC con adición de compuestos activos naturales como aceites esenciales de menta, clavo, albahaca o extractos etanólicos de propóleo (Reyes, 2017), extractos de limón o naranja, ayudando a la disminución mediante la disminución o eliminación de la flora bacteriana de gram (+) como *S. aureus* o gram (-) como *E. coli*.

Como se puede observar, estas películas se han convertido en una alternativa potencialmente viable para suministrar medicamentos y compuestos activos naturales en personas con dificultades de deglución, principalmente en niños y adultos mayores, ya que no requiere de agua para su ingesta y su desintegración se produce de manera rápida, logrando de esta manera hacer una pronta liberación de los principios activos, con la posibilidad de focalizar su acción en el aparato bucofaríngeo o la rápida absorción a través de las mucosas y capilares

presentes en la cavidad bucal y sublingual. A continuación, se relacionan las macromoléculas y plastificante utilizados para la elaboración de las películas del presente estudio:

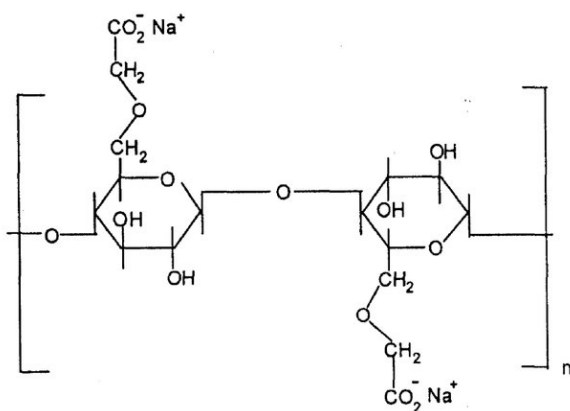
Carboximetil Celulosa Sódica (CMC)

Es un polímero semisintético, soluble en agua, en el cual los grupos CH_2COOH sustituyen a las unidades de glucosa de la cadena celulosa a través de un enlace de éter (C-O-C). los intervalos de peso molecular son desde 21.000 hasta 500.000 g/mol. Debido a que la reacción de formación ocurre en medio alcalino, el producto es la sal sódica del ácido carboxílico $\text{R-O-CH}_2\text{COONa}$. Resistente a la tracción $550\text{-}1050 \text{ kg/cm}^2$. Reacciona con sales de metales pesados para formar películas insolubles en agua, transparentes, relativamente duras e inalterables por materias orgánicas. La figura 1 muestra la estructura molecular del CMC sódico.

Según la ficha de datos de seguridad de Merk-Milipore versión 8.1 la CMC sal sódica de alta viscosidad se identifica con el número CAS 9004.32-4, siendo un polvo de color amarillo, pH neutro a 10g/l a 20°C , densidad aparente de 500 kg/m^3 y densidad relativa de 1,59.

Figura 1

Estructura química de la carboximetil celulosa



Nota. Materiales de sellado cementicios autodegradables (2010). Estructura química del CMC.

https://www.researchgate.net/publication/255247242_Self-degradable_Cementitious_Sealing_Materials/figures?lo=1.

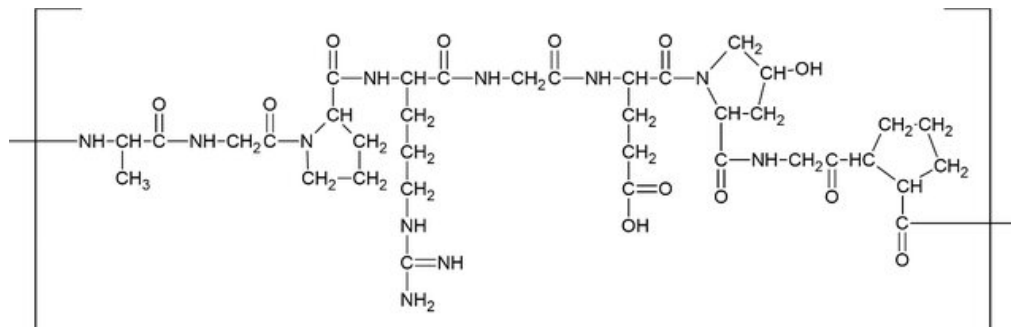
De acuerdo con ficha técnica de Acofarma, se identifica bajo otros sinónimos como carmelosa sódica, Caboximetil éter de celulosa sal sódica o glicolato de celulosa sódica, es prácticamente insoluble en acetona, etanol al 96% y tolueno, oscurece a los 227°C y se quema a los 252°C. Tienen gran adhesividad, por lo que se utiliza en excipientes semisólidos bucales, solubilizada en agua forma geles aniónicos estables a pH 4-10, el incremento de temperatura disminuye la viscosidad, admite la adición de alcohol hasta un 15 a 20%. Soporta bien los electrolitos, aunque los cationes trivalentes provocan un precipitado, incompatible con ácidos fuertes, sales de metales (en específico hierro, aluminio, mercurio, zinc, y plata), goma xantán.

Gelatina

La gelatina es una mezcla de proteínas obtenidas a partir de la hidrólisis ácida o alcalina del colágeno presente en la piel, huesos (oseína) y tendones de animales como el pescado, el cerdo o bovinos fundamentalmente. Como tal, esta mezcla proteica está formada por aminoácidos, aunque al tener bajos o nulos contenidos de valina, triptófano o tirosina, se considera que no tiene valor nutricional. Al igual que con los polisacáridos, el grado de polimerización, la naturaleza de los monómeros y la secuencia de la cadena proteica determina sus propiedades reológicas. El colágeno está formado por tres cadenas de polipéptidos enrolladas en forma de hélice y estabilizada por uniones intramoleculares (entre átomos) formando puentes de hidrógeno entre los grupos carbonilo y aminos permitiendo que forme estructuras de tejido conectivo en la piel, tendones, cartílagos y huesos. La figura 2, muestra la representación de la estructura química general de la gelatina.

Figura 2

Representación estructura química de la gelatina



Nota. Bacterias exopolissacarídeos: características y utilización (2019). Representación estructura química de la gelatina.

https://www.researchgate.net/publication/340284688_Exopolissacarideos_bacterianos_caracteristicas_e_utilizao/figures?lo=1

Las características reológicas de viscosidad y poder gelificante dependen de la materia prima, de su pretratamiento (alcalino o ácido), del método de extracción e hidrólisis del colágeno, del método de concentración de la solución, y del método de secado (Olsen et al., 2003). La gelatina tipo A producida por hidrólisis ácida tiene un punto isoeléctrico entre pH 6,0 y 9,5; es producida a partir de pieles de cerdo y produce gelatinas de baja viscosidad. La gelatina tipo B obtenida por hidrólisis alcalina tiene un punto isoeléctrico entre 4,7 y 5,6; es producida a partir de cuero y hueso bovino y da lugar a una gelatina de alta viscosidad.

Reacciones de acomplejamiento entre taninos y gelatina han sido descritos en la literatura, estas suceden cuando los grupos hidroxilo (-OH) fenólicos del tanino ingresan a las áreas hidrofóbicas de la gelatina, interactuando por enlaces de hidrógeno con los grupos polares de la proteína, tales como: carbonilo (C=O), péptido (-CO-NH-) y guanidina (R₁R₂N)(R₃R₄N)C=N-R₅ y tiene lugar en dos etapas: la primera parte con una interacción débil

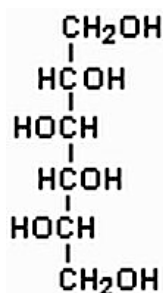
en la que el tanino se ubica en la superficie de una gelatina formando el complejo, y la segunda parte en la que los complejos forman redes hasta que ocurra la precipitación (Yi, Cheng, & Xing, 2015). Es importante señalar que dicha interacción tanino-gelatina tiene la capacidad de conformar tanto complejos solubles como insolubles, dependiendo de la concentración y el tamaño de las moléculas, dado que, el peso molecular y la estructura de estas contribuyen a la precipitación, en el caso de los taninos de gran tamaño, no logran ingresar entre las moléculas de la proteína, mientras que, los de bajo tamaño no son capaces de crear o formar redes efectivas para la precipitación y finalmente los de tamaño mediano que son los que mejor participan de la reacción (Khanittha La-ong, Tanyaporn, & Wilasinee, 2017).

Sorbitol

Es un polialcohol producido por reducción (hidrogenación) a presión de la glucosa, con catalizador de níquel. Es ligeramente soluble en metanol, etanol, ácido acético, fenol y acetamida. También llamado D-sorbita, D-sorbitol o alcohol hexahídrico; su fórmula molecular es $C_6H_8(OH)_6$. Es un excelente humectante y texturizador, es 40% menos dulce que la sacarosa y produce 1,68 kcal/g. El sorbitol actúa como lubricante, afectando las propiedades mecánicas del biopolímero (Bergo et ál., 2008), incrementando el volumen libre entre las cadenas intermoleculares permitiendo mayor movilidad e incrementando la flexibilidad del material, de tal manera que el incremento de la concentración del plastificante, un material duro y quebradizo se tornará más blando (Osswald et ál., 2006). La figura 3 muestra la estructura molecular del sorbitol.

Figura 3

Estructura molecular del sorbitol



Nota. MERK. Estructura molecular del sorbitol.

https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/Sorbitol-CAS-50-70-4-Calbiochem,EMD_BIO-56755 (s.f.)

Aunque el glicerol, es el plastificante más utilizado debido a su mejor estabilidad y compatibilidad con cadenas biopoliméricas hidrofílicas en comparación con sorbitol, polietilenglicol (PEG) y azúcares (Fernández Cervera et al. 2004) para la aplicación requerida no es apto, debido a que incrementa el tiempo de orodegradación.

Díaz-Calderon et al., (2015), evaluó el efecto del sorbitol sobre la cinemática de relajación estructural de películas de gelatina bovina almacenadas a temperatura inferior a la temperatura de transición vítrea (Tg) mostrando que éste, tiene un reconocido efecto reductor de Tg el cual ha sido ampliamente descrito en la literatura al igual que una disminución en el contenido de humedad a la vez que expresa comportamientos característicos de relajamiento estructural debido a su capacidad de disminuir el tamaño de los espacios intermoleculares, con implicaciones en la transferencia de masa a través de la matriz, fenómeno permitiendo modular la difusividad y la estabilidad constitutiva del material fundamental en el diseño ideal de matrices poliméricas vítreas empleadas en sistemas de liberación controlada y la encapsulación de compuestos bioactivos sensibles al oxígeno.

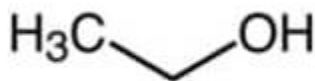
Etanol

También conocido como alcohol etílico, es una sustancia polar ya que contiene un grupo hidroxilo, miscible en agua, acetona, glicerol, isopropanol y acetato de etilo entre otros. Se produce de forma natural por procesos fermentativos o haciendo reaccionar el etano con vapor. La figura 4 presenta la estructura molecular del etanol.

Su función como disolvente en la extracción de principios activos de la pulpa del fruto del totumo (*Crescentia cujete* L.) se debe a su baja toxicidad en comparación con otros alcoholes y su capacidad de disolver sustancias polares y no polares, además al mezclarse con agua forma una solución azeotrópica con punto de ebullición de 78,2°C a una presión de 0,1 MPa. El etanol se ha utilizado para la extracción de aceites esenciales y compuestos fenólicos.

Figura 4

Estructura molecular del etanol



Nota. Fischer Scientific. Estructura molecular del etanol.

<https://www.fishersci.es/es/es/browse/80013631/ethanol> (s.f.)

Métodos de Extracción

La extracción con solventes se basa en la diferencia de concentración entre la estructura que contiene los solutos y la del solvente que arrastra los solutos. Generalmente grandes cantidades de disolvente pueden mejorar la eficiencia de la extracción (Li H. 2005); por el contrario, pequeñas relaciones de disolvente material vegetal pueden propiciar bajos rendimientos de extracción debido a que se alcanza el equilibrio (Valachovic, 2001) y al no

existir diferencia de concentración entre el metabolito en la fase líquida y el presente en la matriz vegetal finaliza el proceso de transferencia de masa.

La maceración se basa en la inmersión de materiales vegetales (gruesos o en polvo) en un recipiente tapado con un disolvente para luego dejarlos reposar a temperatura ambiente durante un periodo definido y con agitación frecuente hasta que se disuelva la materia soluble. Siendo adecuado en el caso de los extractos termosensibles (Swami et al, 2008), la maceración con agitación y calor ha demostrado que disminuye significativamente el tiempo de extracción y el aumento de rendimiento de compuestos fenólicos (González et al., 2016).

La técnica de extracción sólido-líquido mediante Soxhlet utiliza un solvente líquido a temperaturas de ebullición por tiempo prolongado, al finalizar se obtiene un mayor contenido de extracto y la recuperación de cerca del 90% del solvente (Tecnilab, 2024).

La extracción asistida por ultrasonido EAU es una técnica basada en el uso de ondas ultrasónicas para la solubilización de numerosos compuestos de una diversidad de matrices. Esta técnica utiliza pulsos de alta frecuencia (20 kHz) para generar puntos calientes locales a escala macroscópica con alta tensión de cizallamiento y temperatura mediante la producción de burbujas de cavitación, en consecuencia, el soluto se difunde rápidamente de la fase sólida a la líquida, ofreciendo una extracción limpia, de fácil aplicación, eficaz y económica (Roohinejad et al, 2017; Louie et al, 2020).

Metodología

Este proyecto de Investigación deriva del proyecto PSI1901ECBTI2023 - Desarrollo y caracterización de películas de degradación oral enriquecidas con extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizado, avalado en convocatoria interna de la UNAD. Es un proyecto de tipo experimental, cuantitativo – descriptivo.

Obtención de Pulpa y Extractos

El fruto del totumo se obtuvo en la plaza de mercado del barrio Restrepo en Bogotá D.C. los estados de maduración fueron verde y maduro, se abrieron los frutos y se extrajeron las pulpas. En el caso de la pulpa de totumo en estado de maduración verde, se tomaron 1100 gramos y se agregó 200 ml de solución de ácido cítrico al 1,6%. De pulpa madura, se tomaron 355 gramos y se agregaron 50 ml de solución de ácido ascórbico al 1,6%.

Liofilización

Se procedió a congelar las muestras de pulpa fresca en estado verde y maduro con nitrógeno líquido hasta -34°C , posteriormente se llevaron a liofilizar, donde se alcanzaron temperaturas de $-75,6^{\circ}\text{C}$ y presiones de trabajo de 0001 Pa durante 19 horas. Se empleó el equipo marca BOYN Freeze Dryer modelo BNFD-L18MT de 1400 W de poder. Para determinar el rendimiento del proceso de secado por liofilización se llevó control de peso de 2 pares de muestras registrando peso iniciales y finales.

Extracción por Agitación

Se pesó muestras de 20 gramos cada una de pulpa fresca en estado verde y maduro; se les agregó 40 ml de etanol al 96% a cada muestra. La extracción por agitación se realizó a 450 rpm, 45°C por 24 horas. De manera paralela se procedió con una muestra de 10 g de pulpa verde liofilizada y 10 g de pulpa madura liofilizada; a cada muestra se le adicionó 60 ml de etanol. Se mantuvieron los mismos parámetros de agitación, tiempo y temperatura para la extracción.

Extracción por Ultrasonido

Se realizó pesando muestras de 20 g de pulpa en estado fresco verde y maduro, luego se les adicionó 40 ml de etanol a cada una y se llevaron a extracción por 30 minutos a 40 Hz y 45°C de temperatura en equipo de ultrasonido ULTRASONIC CLEANER modelo KSL5120-5. De manera paralela se tomó una muestra de 10 gramos de pulpa verde liofilizada inmersa en 100 ml de etanol al 96% y otra de 10 gramos de pulpa madura liofilizada inmersa en 80 ml de etanol al 96%. Los parámetros de extracción fueron los mismos que para las muestras frescas.

Extracción por Soxhlet

Se procedió a tomar muestras de 10 g de pulpa fresca en estado de maduración verde y otra en estado de maduro, a cada una de ellas se les adicionó 70 ml de etanol; paralelamente, se procedió con dos muestras de pulpa liofilizada, cada una de ellas con peso de 5 gramos, una en estado verde y otra en estado maduro y se les adicionó 70 ml de etanol al 96%. Se utilizó equipo Velp Científica serie 148 y se realizó extracción con la secuencia: inmersión a 110°C por 60 min; lavado a 110°C por 60 min. Enfriamiento por 15 min. 1 solo ciclo.

Una vez obtenidos los extractos se procedió a filtrar con papel filtro Whatman No.1 y se guardaron en frascos ámbar en refrigeración a 4°C hasta su caracterización.

A continuación, la tabla 1 relaciona los extractos obtenidos y las convenciones utilizadas para identificar cada muestra.

Tabla 1*Relación e identificación de extractos obtenidos*

Siglas y convenciones				
VFA= Verde Fresco Agitación			VFU= Verde Fresco Ultrasonido	
MFA= Maduro Fresco Agitación			MFU= Maduro Fresco ultrasonido	
VLA= Verde Liofilizado Agitación			VLU= Verde Liofilizado Ultrasonido	
MLA= Maduro Liofilizado Agitación			MLU= Maduro Liofilizado Ultrasonido	
VLS= Verde Fresco Liofilizado Soxlhet			VFS= Verde Fresco Soxlhet	
MLS= Maduro Fresco Liofilizado Soxlhet			MFS= Maduro Fresco Soxlhet	
Obtención de extractos				
Método	No. ID	Muestra	Pulpa en g.	ml de etanol al 96%
Agitación	1	MFA	20	40
	2	VFA	20	40
	3	VLA	10	60
	4	MLA	10	60
Ultrasonido	5	MFU	20	40
	6	VFU	20	40
	7	VLU	10	100
	8	MLU	10	80
Soxlhet	9	VFS	10	70
	10	MFS	10	70
	11	VLS	5	70
	12	MLS	5	70

Nota. Relación de métodos de extracción y extractos obtenidos junto con la descripción de las abreviaturas que los identifican. Fuente: Elaboración propia

Caracterización de Extractos

Contenido de Fenoles Totales

El contenido de fenoles totales del extracto del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizado se cuantificó siguiendo el método colorimétrico descrito por Singleton & Rossi Jr (1965) con algunas modificaciones, empleando el reactivo Folin-Ciocalteau (mezcla de fosfomolibdato y fosfowolframato) de coloración amarilla, que en presencia fenoles se reducen formando óxidos de coloración azul.

Se elaboró una curva estándar de ácido gálico (100 µg / mL) en concentraciones de 0 a 60 µL a intervalos de 10 µl y la adición de etanol hasta un volumen final de 100 µL, seguido de la adición de 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteau (1/10). Después de 2 min, se adicionó 400 µl de carbonato de sodio (4%). Las muestras fueron incubadas por 60 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz para su posterior lectura en el espectrofotómetro UV-vis Lan Optics LT 2100 a 760 nm.

Para la cuantificación del contenido de fenoles totales en las muestras de extracto liofilizado del fruto de totumo, se tomaron 100 µL de solución y 900 µL etanol absoluto, con posterior adición del reactivo de Folin- Ciocalteau y del carbonato de sodio, como se realizó en la curva estándar. Los resultados fueron expresados como µg de Ácido Gálico / mL de extracto.

Contenido de Flavonoides Totales

La determinación del contenido de flavonoides del extracto del fruto de totumo liofilizado se realizó siguiendo metodología colorimétrica descrita por Kumazawa, Hamasaka, & Nakayama (2004); Miliauskas, Venskutonis, & van Beek (2004).

Una curva estándar de quercetina en concentraciones de 0, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 7.2 y 9.6 µg / ml, utilizando como diluyente etanol absoluto y se adicionó cloruro de aluminio (este catión induce la formación de complejos estables de los flavonoides y produce un desplazamiento batocrómico de la absorción de luz y una intensificación de la absorción), después de incubación por 40 min a temperatura ambiente protegida de la luz, con lecturas de las absorbancias a 415 nm en espectrofotómetro UV-Vis.

La determinación de flavonoides totales se realizó de la siguiente manera: a 50 µl de la muestra diluida en 1150 ml de etanol absoluto se adicionaron 50 µl de solución de cloruro de aluminio (2%). El período de incubación y las lecturas de las absorbancias se realizaron como en la curva estándar. Los resultados se expresados en µg de Quercetina / mL de extracto.

Determinación de la Capacidad Antioxidante por Captura del Radical Libre DPPH*

La determinación de la capacidad antioxidante de los extractos del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizados se cuantificaron por el grado de descoloración del radical DPPH*, siguiendo la metodología descrita por Brand- Williams, Cuvelier, & Berset (1995).

Para la determinación de la Concentración Eficiente de antioxidante para inhibir 50% de la concentración inicial de DPPH* (EC₅₀), se realizó una curva con seis concentraciones diferentes del extracto liofilizado del fruto de totumo en ambiente oscuro; una alícuota de 0,1 mL fue transferida a una solución de 3,9 mL del radical DPPH* (0,06mM). Las lecturas fueron realizadas a 515 nm al tiempo cero en a los 60 minutos. La actividad secuestradora del radical fue determinada como la disminución de la absorbancia de DPPH*

Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de los extractos del fruto de totumo (*Crescentia cujete* L.) liofilizados fueron determinados por el método de difusión en disco frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Streptococcus mutans* (ATCC 25175).

Inicialmente, las bacterias *S. aureus* y *S. mutans* fueron reactivadas en caldo Cerebro Infusión (BHI) mientras que la *E. coli* fue reactivada en caldo lactosa. Se llevaron a incubar a 37°C durante 24 horas hasta obtener suspensiones microbianas de turbidez al tubo de 0,5 en la escala McFarland, lo que corresponde a 10⁸ UFC / mL. La suspensión diluida fue sembrada con hisopos estériles en la superficie de las placas que contenían agar nutritivo en el caso de *S. aureus* y *S. mutans*, y agar lactosa para la *E. coli* (Reyes et al, 2023, Rosalem, & Ribeiro, 2013). Se colocaron 20 µl del extracto en discos de papel filtro (Whatman N° 1) de 6 mm de diámetro previamente esterilizados en luz ultravioleta por 30 minutos (Reyes et al, 2023). Los discos se ubicaron en la superficie de las placas e incubadas a 37°C durante 24 horas. Después de este

período el diámetro de inhibición se midió considerando el diámetro de los discos en milímetros (6 mm).

Análisis en el Infrarrojo (FTIR)

El análisis de las muestras se realizó con equipo FT/IR 4X marca JASCO con accesorio ATR de un solo rebote. Para ello se tomaron muestras de los extractos y se analizó el espectro de los compuestos presentes en un rango de número de onda entre 400 a 4000 cm^{-1} .

Elaboración y Caracterización de Películas de Degradación Oral

Elaboración de Películas

Las películas de degradación oral fueron producidas a partir de gelatina tipo A (2g/100 g solución) y carboximetil celulosa (CMC) (1g/100 g solución) que actuaron como macromoléculas, mientras que se utilizó como plastificante sorbitol (polialcohol) en concentración de 20 g/ 100 g de macromoléculas. Inicialmente la gelatina se hidrató en agua a temperatura ambiente por 30 min, con posterior solubilización a 55 °C por 30 min. En paralelo, la CMC fue disperso en agua sobre agitación magnética hasta su completa disolución (Heinemann, Carvalho, & Favaro-Trindade, 2013). Las soluciones de las macromoléculas se mezclaron, se adicionó el plastificante y el extracto de totumo identificado como Verde-Liofilizado-Soxhlet (VLS) en concentraciones de 0, 4, 5, 6 y 7%, se homogenizó en un agitador rotor-estator y la solución final se dispuso en cajas de Petri de 150 mm de diámetro y se secaron a temperatura ambiente por 48 horas. Posterior al secado, las películas se acondicionaron en desecadores conteniendo bromuro de sodio (NaBr 58% HR) hasta su caracterización (Bodini, 2015, Bodini et al., 2019; Reyes, 2023).

Espesor de las Películas

El espesor se midió con un Micrómetro digital Mitutoyo 0-12,7 mm de resolución 0,001 mm para ello se procedió a tomar medidas por triplicado de cada una de las películas.

Color y Barrera a la Luz de Películas

Se procedió a realizar inspección visual de las películas de degradación oral y posteriormente se cortaron cintas de 2 cm de ancho y se tomaron lecturas en espectrofotómetro UV-visible entre 200 y 700 nm y se reportaron los valores en % de transmitancia.

Tiempo de Desintegración en Películas

El tiempo de desintegración de las películas fue realizada según la metodología descrita por Garsuch & Breitzkreutz (2010). Las muestras de películas (20 x 30 mm) fueron fijadas en un soporte y una gota de agua destilada (200 μ L) fue depositada sobre la película. El tiempo necesario para formar un agujero en la película fue fijado como el tiempo de desintegración en segundos. El análisis fue realizado en triplicado.

Solubilidad de las Películas

Se utilizó la metodología descrita por Reyes et al, (2021). Se cortaron muestras de las películas en círculos de 2,5 cm de diámetro y secadas a 100 °C por 24 h para obtener un peso constante, posteriormente las muestras secas fueron inmersas en 80 mL de agua destilada por 24 horas y finalmente, se extrajeron del agua y llevadas a secado nuevamente bajo condiciones anteriormente mencionadas. La solubilidad en agua de las películas fue determinada como pérdida porcentual (%) de peso.

Humedad de las Películas

La determinación de humedad de las películas se realizó por método termogravimétrico, se pesaron las muestras que se secaron a medio ambiente por 48 horas (después del proceso solvent casting), luego se llevaron a secado en horno por 24 horas a 100 °C hasta peso constante. La humedad porcentual se determinó como: $H\% = (\text{peso seco final muestra} / \text{peso inicial húmedo muestra}) * 100$.

Actividad Antimicrobiana en Películas

Las cepas empleadas en los análisis microbiológicos del extracto liofilizado y de las películas de degradación oral fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175. La activación de las bacterias se realizó siguiendo los mismos parámetros descritos para los extractos. Para la análisis, las películas fueron cortadas en discos de 25 mm y posteriormente colocadas sobre la superficie de las placas, e incubadas a 26°C por 24 h. El procedimiento para la determinación del halo de inhibición se realizó considerando las medidas de diámetro inicial de 25 mm.

Fenoles Totales en Películas

Las muestras de película (0,1 g de muestra/mL de solución) fueron inmersas en 6 ml agua por 50 minutos a temperatura de 50°C, luego se adicionaron 4 ml de alcohol etílico al 96%, posteriormente se agitó a 100 rpm y temperatura constante (25 °C) para la extracción de los compuestos fenólicos. Para eliminar la matriz polimérica se procedió a centrifugar a 5000 rpm por 5 min. La concentración de compuestos fenólicos fue determinada por el método de Folin-Ciocalteu (Reyes et al, 2021; Borges, 2017) y el contenido expresado como mg GAE/g de película.

Liberación in Vitro en Películas

La liberación in vitro se realizó de acuerdo con previas metodologías, (Borges, 2017; Perumal, Govender, Lutchman, & Mackraj, 2008; Borges & De Carvalho, 2015). Las muestras de películas de degradación oral (2,5 x 2,5 cm) se sumergieron en solución tampón fosfato salino (pH 6,8) a 37 °C con agitación constante a 100 rpm (Shaker MA-420). Alícuotas (0,1mL) se retiraron en diferentes tiempos (0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 minutos). Para mantener el volumen constante durante el análisis, el sistema se realimentó con solución tampón (volumen igual al retirado) al mismo tiempo que las alícuotas se retiraron. La concentración de

compuestos fenólicos se determinó por el método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi Jr, 1965). El análisis se realizó en triplicado.

Perfil de Liberación en Películas

La cinética de liberación de los compuestos fenólicos de las películas de degradación oral se evaluó utilizando los modelos matemáticos: Orden cero, Higuchi, Peppas & Sahlin, Korsmeyer & Peppas. Las constantes de los modelos se determinaron a través del paquete estadístico STATISTICA® v.8.0. (Borges, 2017).

Análisis en el Infrarrojo (FTIR) de Películas

El análisis de las muestras se realizó con equipo FT/IR 4X marca JASCO con accesorio ATR de un solo rebote. Para ello se tomaron muestras de las películas sin y con adición de extracto en concentraciones de 4, 5, 6 y 7% y se analizó el espectro de los compuestos presentes en un rango de número de onda entre 400 a 4000 cm^{-1} .

Análisis Estadístico

La evaluación de los resultados se realizó mediante análisis multivariado (ANOVA), estableciendo diferencias significativas entre los valores medios observados en cada formulación mediante la prueba de Fisher al 95 % de confianza.

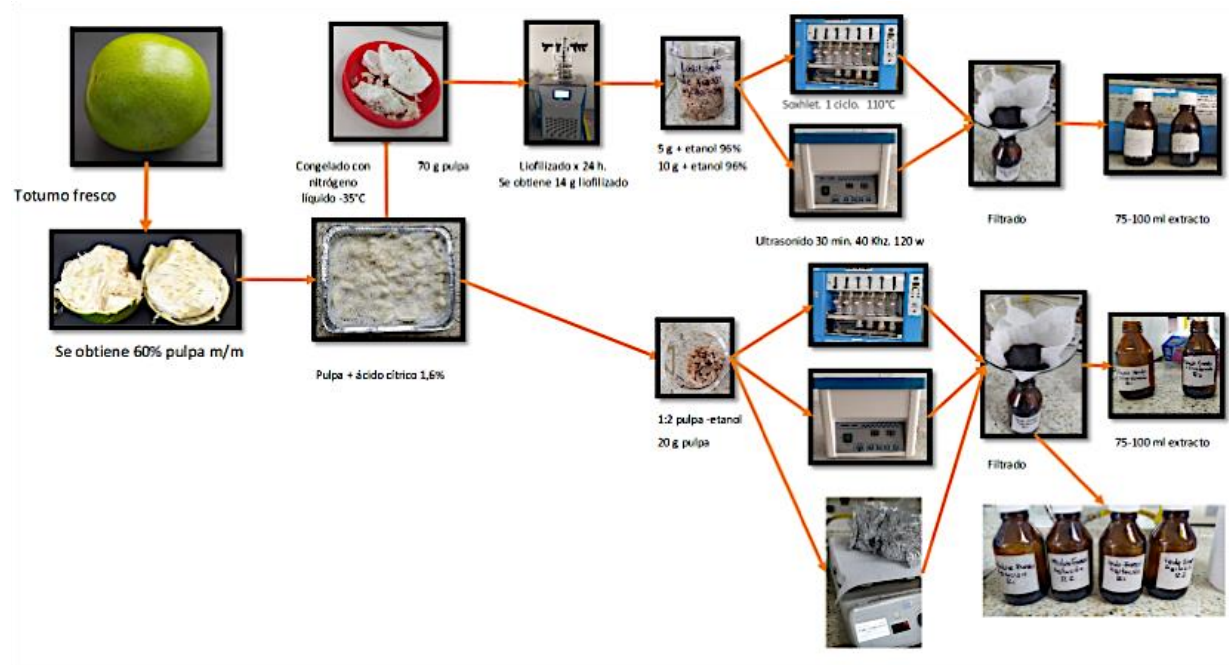
Resultados y Discusión

Obtención de Pulpa y Extractos de Totumo (*Crescentia cujete* L)

La figura 5 presenta el proceso de obtención de pulpa, liofilización y obtención de extractos por métodos de agitación, ultrasonido y soxhlet.

Figura 5

Proceso de obtención de extractos



Nota. Laboratorio LIDA UNAD. (2024) Proceso de obtención de extractos. Fuente: elaboración propia.

Liofilización

El proceso de liofilización consiste en la eliminación de agua por sublimación, para ello, la pulpa se congeló inicialmente con nitrógeno líquido, luego se dispuso en la cámara de vacío del equipo liofilizador.

Para determinar el rendimiento del proceso de secado por liofilización se llevó control de peso de 2 pares de muestras registrando peso iniciales y finales que se relacionan en la tabla 2.

Tabla 2*Perdida de humedad de pulpa de totumo sometido a liofilización*

Pérdida de humedad por liofilización		
Pulpa de totumo	Peso inicial en g	% Humedad perdida \pm DS
Verde	30	81,57 \pm 0,91
Madura	28	73,76 \pm 0,10

Nota. Datos de pérdida de humedad de pulpa de totumo fresca en estado verde y maduro

sometido a liofilización. Fuente: elaboración propia.

La liofilización permite retirar hasta el 81,57 \pm 0,91% de humedad de la pulpa de totumo con grado de madurez verde y hasta un 73,76 \pm 0,1% de humedad de la pulpa de totumo maduro.

Contenido de Fenoles y Flavonoides Totales en Extractos de Totumo

Los resultados para fenoles se expresaron como mg GAE/g de extracto, para los flavonoides totales se expresaron como mg QE/g de muestra. La tabla 3 presenta los contenidos de fenoles y flavonoides totales presentes en los extractos de totumo.

Tabla 3

Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de totumo según tratamientos aplicados

Método de extracción	Estado físico	Grado Madurez	Muestra	mg GAE/g \pm DS	mg QE / g \pm DS
Agitación	Fresco	Verde	VFA	0,30 \pm 0,03 ^a	0,03 \pm 0,004 ^{a,b,c}
		Maduro	MFA	0,46 \pm 0,03 ^a	0,01 \pm 0,002 ^a
	Liofilizado	Verde	VLA	2,69 \pm 0,47 ^d	0,09 \pm 0,003 ^e
		Maduro	MLA	2,12 \pm 0,07 ^c	0,05 \pm 0,039 ^{c,d}
Ultrasonido	Fresco	Verde	VFU	0,60 \pm 0,15 ^a	0,02 \pm 0,002 ^{a,b,c}
		Maduro	MFU	0,58 \pm 0,05 ^a	0,01 \pm 0,004 ^{a,b}
	Liofilizado	Verde	VLU	4,56 \pm 0,38 ^e	0,08 \pm 0,028 ^{d,e}
		Maduro	MLU	2,09 \pm 0,31 ^c	0,04 \pm 0,032 ^{a,b,c,d}
Soxhlet	Fresco	Verde	VFS	0,70 \pm 0,18 ^a	0,05 \pm 0,015 ^{b,c,d}
		Maduro	MFS	1,51 \pm 0,15 ^b	0,02 \pm 0,037 ^{a,b,c}
	Liofilizado	Verde	VLS	4,70 \pm 0,40 ^e	0,14 \pm 0,013 ^f
		Maduro	MLS	4,44 \pm 0,14 ^e	0,09 \pm 0,053 ^e

Nota. Contenidos de fenoles (mg GAE/g \pm DS) y flavonoides (mg QE / g \pm DS) totales presentes

en los extractos de totumo según tratamientos aplicados. Fuente: Elaboración propia. Letras minúsculas a, b, c, d, e, f indican diferencias significativas para cada tratamiento de extracto de totumo.

El mayor contenido de fenoles totales corresponde a la muestra VLS con 4,70 \pm 0,40 mg GAE/g pulpa de totumo, seguido de 4,56 \pm 0,38 mg GAE/g pulpa de totumo de la muestra VLU; mientras que, el menor contenido corresponde a la muestra VFA, con tan solo 0,296 mg GAE/g de pulpa de totumo.

Respecto al contenido de flavonoides el extracto VLS reportó un valor de 0,14 \pm 0,013 mg QE/g, y el menor contenido se presentó en el extracto MFA con un valor de 0,01 \pm 0,002 mg EQ/g muestra.

El análisis estadístico ANOVA según prueba de Fischer demuestra como la interacción entre factores como el método de extracción, el estado físico de la muestra y de madurez del

fruto pueden influir en los resultados obtenidos, resaltando que el extracto proveniente de frutos verdes, sometidos a liofilización y obtenido por el método soxhlet y utilizando etanol como solvente presenta mayor rendimiento en la obtención fenoles y flavonoides totales.

L. Gutiérrez, (2022), reporta contenidos de fenoles $0,107 \pm 0,008757$ mg GAE / g de muestra siguiendo en principio el mismo procedimiento colorimétrico y como solvente de extracción cloroformo, mientras que Narváez (2010) reporta en torta de semillas de *crescentia cujete* L. 1,41 g de GAE/100 g de muestra y Dasgupta y Mehta, (2023) $69,34 \pm 0,42$ mg GAE /g a partir de fruto en polvo diluidas en metanol como solución madre con posteriores tratamientos con hexano y cloroformo para eliminar grasas, acetato de etilo y finalmente n-butanol para extracción final. Este mismo autor reportó contenidos de flavonoides totales de $86,72 \pm 0,15$ mg/g QE; mientras que Espitia-Baena et al (2011) reportó abundante contenido de flavonoides a partir de 800 g de epicarpio logró obtener 15,8 g de extracto etanólico total seco sometido a pruebas cualitativas de Shinoda y test de leucoantocianinas; por otro lado, Billacura et al (2017) realizó test reactivo alcalino a extractos de fruta fresca, en decocción y en extracto de acetato de etilo, encontrando valoraciones moderadas en el primer caso y leves en las siguientes muestras y finalmente Rivera Mondragón et al (2020) reportan presencia de flavonoides como luteolin-7-O-glucosido a razón de 1,7 ppm- y naringenina en concentraciones de 0,1 ppm confirmadas a partir de pruebas UPLC-MS/MS y NMR.

Como se puede observar, los contenidos de fenoles y flavonoides reportados difieren entre unos y otros, esto debe no solo a factores intrínsecos (fenomenológicos de la planta) y extrínsecos (suelo, nutrientes, exposición solar, temperatura, etc.) que pueden influir en la expresión de estos compuestos, sino también al procedimiento de determinación, el tipo de solvente utilizado y los métodos de extracción empleados.

Determinación de Capacidad Antioxidante por Captura del Radical Libre DPPH•

Para determinar la capacidad antioxidante de los extractos de pulpa de totumo (*Crescentia cujete* L) se consideraron las muestras en estado de maduración verde, en estado liofilizadas obtenidas por extracción Soxhlet y ultrasonido (VLS; VLU), que manifestaron un mayor contenido de fenoles totales para ser correlacionadas con muestras verdes en estado físico fresco obtenidas igualmente por extracción soxhlet y ultrasonido (VFS; VFU). La tabla 4 presenta los resultados de % de inhibición EC_{50} de los extractos seleccionados.

Tabla 4

Resultados capacidad antioxidante frente a radical DPPH•

Resultados capacidad antioxidante extractos de totumo frente a radical DPPH•			
Factores	Muestra	EC_{50} $\mu\text{g/ml}$	% inhibición
Verde-Liofilizada-Soxhlet	VLS	$188,91 \pm 0,41^a$	$54,60 \pm 0,1^d$
Verde-Fresca-Soxhlet	VFS	$444,78 \pm 1,80^d$	$24,95 \pm 0,41^a$
Verde-Liofilizada-Ultrasonido	VLU	$237,22 \pm 3,52^c$	$51,60 \pm 0,93^c$
Verde-Fresca-Ultrasonido	VFU	$204,62 \pm 1,12^b$	$44,08 \pm 0,90^b$

Nota. Laboratorio LIDA UNAD 2024. Fuente: Elaboración propia. Letras minúsculas a, b, c, d, e, f indican diferencias significativas para cada tratamiento de extracto de totumo.

El extracto VLS tiene un desempeño en la inhibición de radical DPPH• con un $EC_{50} = 188,91 \pm 0,41 \mu\text{L}$ de extracto para eliminar el 50% del radical al cabo de 60 minutos, en comparación con el trolox estándar $EC_{50}=2,95\mu\text{g/ml}$. Si bien es evidente la eficiencia antirradicalaria del trolox en comparación con los extractos de totumo, también es claro que estos poseen actividad antioxidante.

De acuerdo con otros estudios realizados, Das et al (2014) en análisis fitoquímico del extracto crudo de etanol de hojas y corteza del tallo reveló la presencia de esteroides, flavonoides, saponinas, taninos, glucósidos y terpenoides, mostrando una importante actividad eliminadora de DPPH•, ($IC_{50} = 8,78 \mu\text{g/ml}$) en comparación con el ácido ascórbico estándar (IC_{50}

= 7,68 µg/ml). Gutiérrez (2022) recolectó frutos en Davao, Filipinas y utilizando cloroformo para la extracción de compuestos activos evaluó la capacidad antioxidante de extractos fenol-terpenoide de pulpa de *Crescentia cujete* L. frente al radical DPPH', utilizando como patrón ácido ascórbico obteniendo un valor para el extracto de % IC₅₀ = 36,91 frente a un % IC₅₀ = 0,1519 de ácido ascórbico a partir de una solución 0,1 mM de DPPH' en metanol.

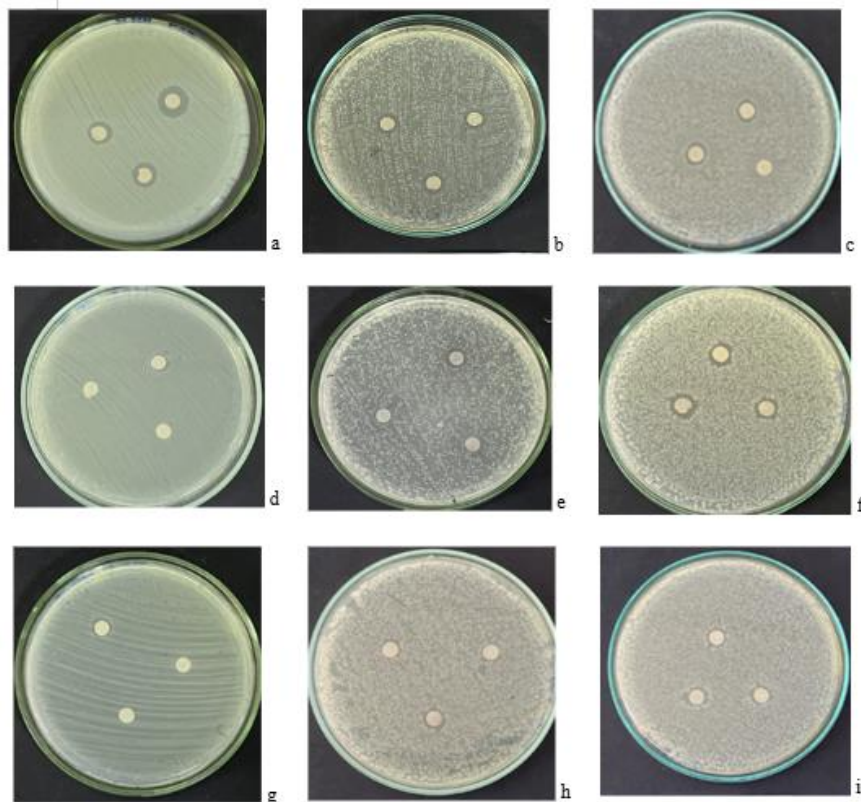
Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Totumo

La actividad antimicrobiana de los extractos de la pulpa de totumo (*Crescentia cujete* L.) se determinó por el método de difusión en disco frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans*.

A continuación, la figura 6 presenta imágenes de los resultados obtenidos durante el ensayo de inhibición tomadas en laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD sede nacional José Celestino Mutis. En ellas se destaca la presencia de halos de inhibición en el extracto VLS con relación a las cepas *E. coli* y *S. mutans*. Posteriormente se presentarán los diámetros de dichos halos para determinar cuantitativamente su efecto.

Figura 6

Actividad antimicrobiana de extractos de totumo



Nota. La figura 6 muestra halos de inhibición a) Extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet. VLS. Frente a cepa *E. coli*; b) Extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet. VLS frente a cepa *S. aureus*; c) Extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet. VLS frente a cepa *S. mutans*; d) Extracto de totumo Verde-Fresco-Ultrasonido. VFU frente a cepa *E. coli*; e) Extracto de totumo Verde-Liofilizado- Ultrasonido. VLU frente a cepa *S. aureus*; f) Extracto de totumo Verde-Fresco-Ultrasonido. VFU frente a cepa *S. mutans*; g) Extracto de totumo Verde-Fresco-Soxlet. VFS frente a cepa *E. coli*; h) Extracto de totumo Verde-Liofilizado-Ultrasonido. VLU frente a cepa *S. aureus* i) Extracto de totumo Verde-Fresco-Soxlet. VFS frente a cepa *S. mutans*. Fuente: Elaboración propia

La tabla 5 presenta los resultados antimicrobianos de los extractos de totumo frente a las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans*.

Tabla 5

Resultados actividad antimicrobiana de extractos de totumo

Resultados halos de inhibición de extractos de totumo frente a <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> y <i>S. mutans</i>						
Grado madurez	Estado físico	Método extracción	Muestra	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. mutans</i>
Maduro	Fresco	Agitación	MFA	0 ± 0 ^a	0 ± 0 ^a	3,5 ± 4,95 ^a
Maduro	Fresco	Soxhlet	MFS	6,17 ± 4,48 ^{a, b}	0 ± 0 ^a	4 ± 5,66 ^a
Maduro	Fresco	Ultrasonido	MFU	0 ± 0 ^a	2,5 ± 3,54 ^{a, b}	5,83 ± 4,48 ^a
Maduro	Liof.	Agitación	MLA	2,83 ± 4,01 ^{a, b}	0 ± 0 ^a	3 ± 4,24 ^a
Maduro	Liof.	Soxhlet	MLS	4 ± 5,66 ^{a, b}	0 ± 0 ^a	7,5 ± 1,65 ^a
Maduro	Liof.	Ultrasonido	MLU	6 ± 5,19 ^{a, b}	3,67 ± 5,19 ^{a, b}	8,67 ± 1,41 ^a
Verde	Fresco	Agitación	VFA	2,33 ± 3,3 ^a	0 ± 0 ^a	3,5 ± 4,95 ^a
Verde	Fresco	Soxhlet	VFS	0 ± 0 ^a	2,33 ± 3,3 ^{a, b}	7,67 ± 0,47 ^a
Verde	Fresco	Ultrasonido	VFU	3,83 ± 5,42 ^{a, b}	0 ± 0 ^a	8,83 ± 1,18 ^a
Verde	Liof.	Agitación	VFA	1,5 ± 2,12 ^a	2,5 ± 3,54 ^{a, b}	7,5 ± 0,71 ^a
Verde	Liof.	Soxhlet	VLS	10,83 ± 2,59 ^b	7 ± 1,89 ^b	7,83 ± 2,12 ^a
Verde	Liof.	Ultrasonido	VLU	0 ± 0 ^a	2,5 ± 3,54 ^{a, b}	8,5 ± 1,65 ^a

Nota. La tabla presenta los resultados antimicrobianos de los extractos de totumo frente a las cepas *E. coli*, *S. aureus* y *S. mutans*. Fuente: Elaboración propia. Letras minúsculas diferentes en cada columna indican diferencias significativas para cada tratamiento de extracto de totumo.

El extracto de totumo VLS alcanzó en promedio halos de inhibición de 10,83 ± 2,59 mm frente a la cepa gram negativa *E. coli*; de 7,0 ± 1,89 mm, en relación al *S. aureus* y de 7,83 ± 2,12 mm frente al *S. mutans*, mientras que el extracto VFU presentó mayor actividad frente al *S. mutans* con valores de 8,83 ± 1,18 mm seguido de los extractos MLU, VLU con valores de 8,67 ± 1,41 mm y 8,50 ± 1,65 mm respectivamente. En general, todos los extractos tuvieron alguna respuesta frente al *S. mutans*, mientras que frente al *S. aureus* los extractos no mostraron mayor actividad.

Prabukumar, et al (2017) demostró actividad antibiótica de nanopartículas de oro reducidas a partir de extracto acuoso de hojas de totumo (*Crescentia cujete* L) en patógenos gram negativos *E. coli*, y patógenos gram positivos *B. subtilis*, encontrando que dicha actividad depende de la dosis, tamaño de la superficie, el tipo de patógeno (género y especie) debido a diferencias en el espesor y composición de la membrana; aunque en las bacterias gram positivas las capas de peptidoglicano son más gruesas que las gram negativas, estas últimas cuentan con una fina capa de lipopolisacáridos LPS (Shamaila et al., 2016; Malanovic y Lohner, 2016; Roversi, et al 2014)

Hasanah, Widhiastuti y Syaefudin (2018), realizaron pruebas con extracto etanólico de pulpa y corteza de berenuk (*Crescentia cujete* L) para determinar la actividad antibacteriana en relación con el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; el análisis fitoquímico mostró que la cáscara del árbol que contenía alcaloides, saponinas, taninos y flavonoides, mientras que la pulpa presentaba alcaloides y flavonoides. La importancia de este análisis se basa en que el mecanismo del alcaloide como agente antibacteriano permeabiliza las células e inhibe la bomba de eflujo de las ATPasas (Chusnie y Cushnie., 2014). Mientras que la saponina puede interactuar con la membrana celular a través de enlaces de hidrógeno, sus propiedades similares a las de un detergente pueden aumentar la permeabilidad de la membrana sin destruir las células y aumentar la afluencia de nutrientes (Arabski et al., 2012). También se informó que los flavonoides son eficaces como antimicrobianos, interactuando con el grupo de cabeza polar de la membrana seguido de la penetración en regiones hidrófobas (Mengying, et al., 2014). Esta investigación demostró que el extracto etanólico de la cáscara y la pulpa del fruto de berenuk tenía poco potencial como agente antimicrobiano frente a *E. coli*, ya que la concentración mínima inhibitoria (CIM) obtenida fue alta.

El *Staphylococcus aureus*, estructura en racimos en forma de uvas y pertenece al grupo ESKAPE, acrónimo de un grupo de patógenos intrahospitalarios, y se refiere a: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* que son resistentes a antimicrobianos (De Oliveira et al., 2020).

Esta bacteria forma una capa de fibrina que se deposita sobre la bacteria e inhibe la fagocitosis y produce biopelículas mientras crea abscesos, esta sustancia polimérica extracelular (EPS) consiste principalmente en polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (eDNA), que busca proteger a las células de factores ambientales nocivos, incluidos los antibióticos y el sistema inmunitario del hospedero (Hall-Stoodley et al., 2004).

Cabe resaltar que cuando se plantea el uso de extractos como antimicrobianos, se pretende que al igual que con el uso de medicamentos de uso clínico, la acción sobre estructuras o funciones bacterianas ya sea inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplásmica, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis y las funciones de ácidos nucleicos (Calvo y Martínez, 2008).

Análisis en el Infrarrojo (FTIR) de los Extractos

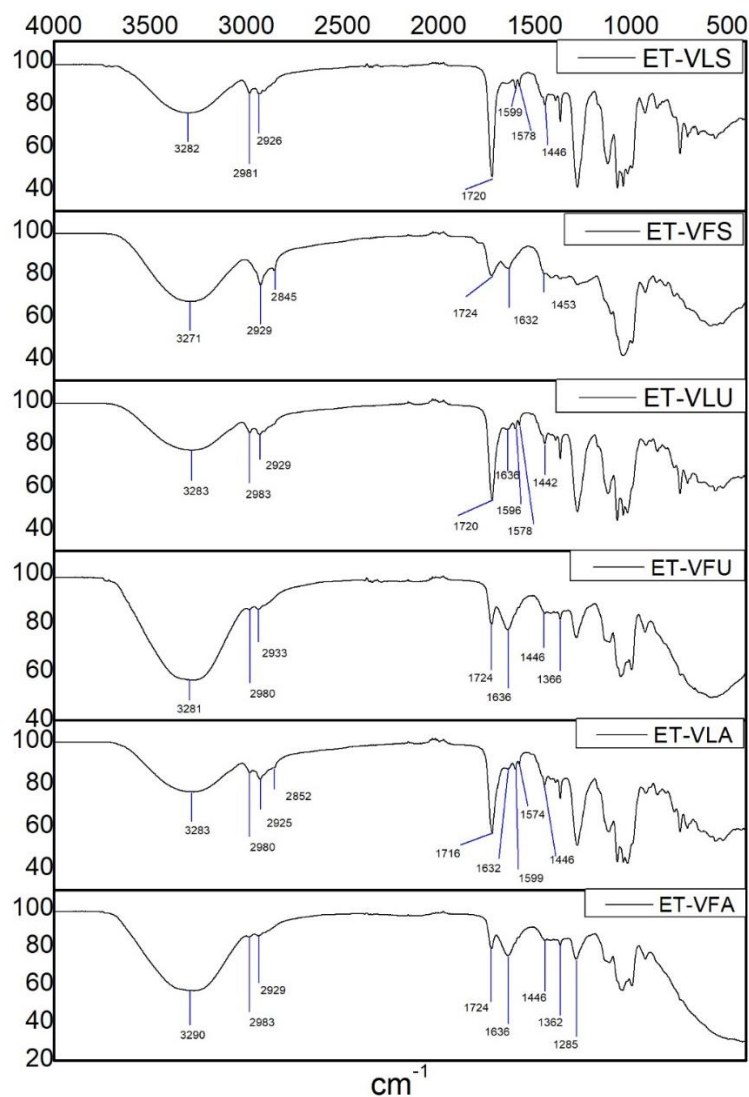
Para efectos de esta investigación, se presentan gráficas FTIR de extracto de totumo Verde en estados fresco y liofilizado (VFA; VFL; VFU; VLU; VFS; VLS) con variación en la técnica de extracción.

Las señales características de los grupos funcionales de los extractos fueron analizadas en el rango de los 400 a los 4000 cm^{-1} para elucidar la presencia de diferentes grupos funcionales de las moléculas presentes en el extracto.

A continuación, la figura 7 presenta una secuencia de gráficas FTIR realizadas en el laboratorio LIDA de la UNAD en los rangos de 4000 a 1500 cm^{-1} y la figura 8 la secuencia de gráficas FTIR en el rango de 1500 a 400 cm^{-1}

Figura 7

Gráfica FTIR de extractos de totumo. Rango 4000-1500 cm^{-1}

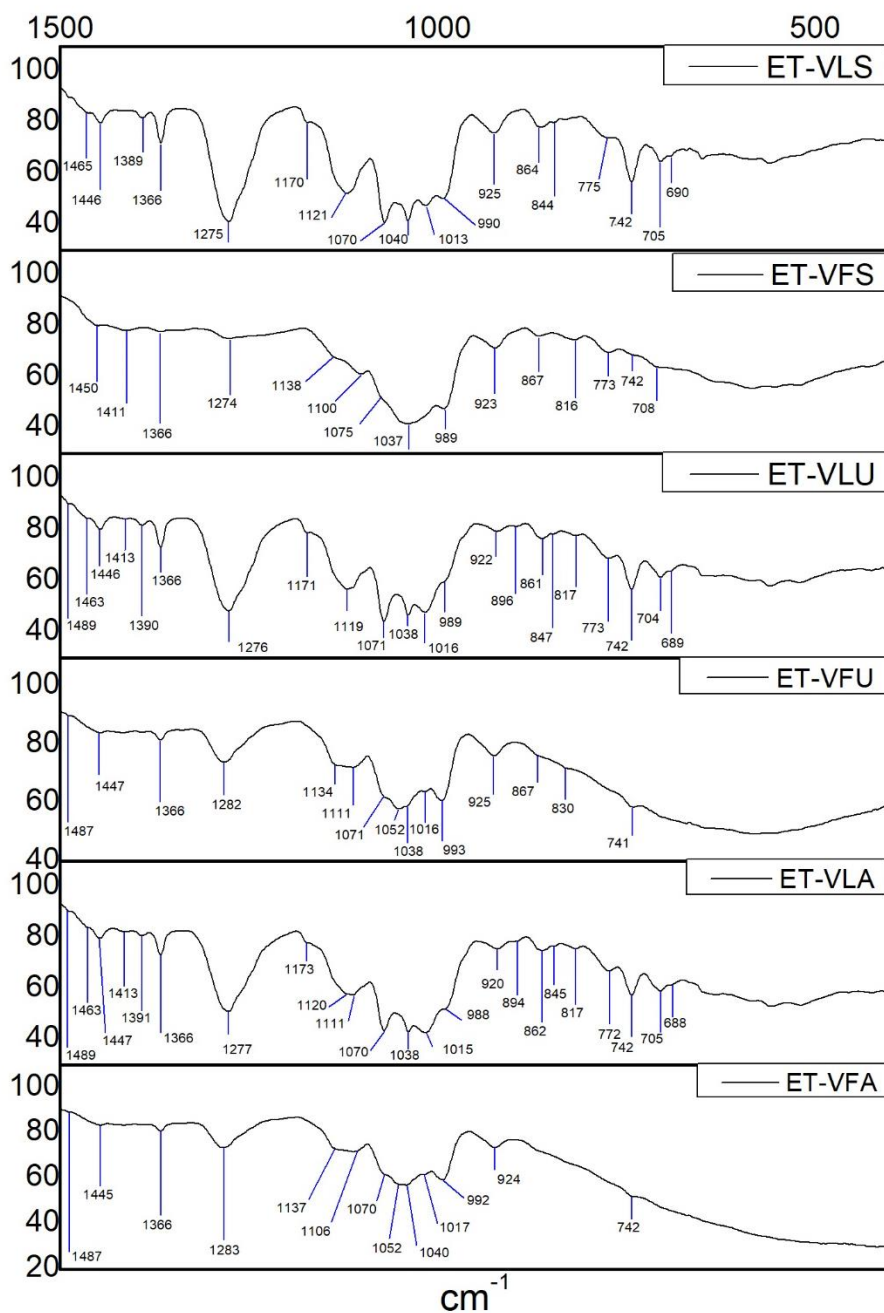


Nota. Gráfica FTIR de extractos de totumo verde en estado fresco y liofilizado sometidos a diferentes métodos de extracción. Rango 4000-1500 cm^{-1} Laboratorio LIDA UNAD 2024.

Fuente: Elaboración propia

Figura 8

Gráfica FTIR de extractos de totumo. Rango 1500-400 cm^{-1}



Nota. Gráfica 8 de FTIR de extractos de totumo verde en estado fresco y liofilizado sometidos a diferentes métodos de extracción. Rango 1500-400 cm^{-1} Laboratorio LIDA UNAD 2024. Fuente:

Elaboración propia

La tabla 6 muestra la identificación de las principales señales características de los espectros de extractos de totumo VFA; VFL; VFU; VLU; VFS; VLS.

Tabla 6

Identificación de las principales señales características de los espectros de extractos de totumo VFA; VFL; VFU; VLU; VFS; VLS.

Numero de onda en cm^{-1}	Tipo de señal	Tipo de enlace	Grupos funcionales
3270-3290	Tensión	O-H	Fenoles, ácidos carboxílicos y formación de puentes de hidrógeno
2980-2933	Vibraciones de tensión	C-H	Alcanos
1724-1716	Tensión	C=O	Aldehído, ácidos carboxílicos
1632-1626	Tensión	C=C	Alquenos
1578	Vibración estructura	C=O	Anillos aromáticos
1446	Flexión asimétrica	C-H	Metilo
1366	Flexión simétrica	C-H	Metilo
1276	Tensión	C-O	Ácidos carboxílicos
1220	Tensión	C-O	Fenoles
1150	Tensión	C-O	Alcoholes terciarios
1100	Tensión	C-O	Alcoholes secundarios
1030	Tensión	C-O	Alcoholes primarios
1017-992	Flexión	C-H	Alquenos monosustituidos
925-900	Flexión	C-O-H	Ácidos carboxílicos
742	Vibraciones de absorción	=CH	Aromáticos monosustituidos, Anillo bencénico
705-690	Vibraciones de absorción	C-H	Alcanos

Nota. VFA: Verde-Fresco-Agitación; VFL: Verde-Fresco-Liofilizado; VFU: Verde-Fresco-Ultrasonido; VLU: Verde-Liofilizado-Ultrasonido; VFS: Verde-Fresco-Soxhlet; VLS: Verde-Liofilizado-Soxhlet. Fuente: Elaboración propia.

Como se puede observar, las señales características de los enlaces O-H centrados alrededor de los 3280 cm^{-1} son menos pronunciadas en los extractos liofilizados que en los frescos, esto se debe probablemente a la relación entre compuestos de los extractos liofilizados y solvente es más reducida, mientras que los extractos frescos contienen más agua. Resultando la

lío-filización, un proceso que ofrece mayor capacidad de extracción e identificación de señales como se aprecia fundamentalmente al comparar las lecturas FTIR entre extractos frescos y lío-filizados. Por otro lado, al comparar los métodos de extracción, se observa que el Soxhlet ofrece un mayor grado de extracción que se aprecia no solo en el número de bandas, sino también en la definición e intensidad de las mismas.

Caracterización de Películas de Degradación Oral

Una vez obtenida la película de control (sin extracto) denominada F1, se procedió a funcionalizar las películas con extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet que exhibió mayor contenido de fenoles en la caracterización de extractos y se identificaron como: F2 4% ET-VLS; F3 5% ET-VLS; F4 6% ET-VLS; Y F5 7% ET-VLS.

Espesor de las Películas de Degradación Oral

El espesor de las películas se midió con un Micrómetro digital Resolución 0,001 mm.

Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Espesor de películas con adición de diferentes porcentajes de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet

Formulación	Media± D.E.
F1- 0% Extracto	0,05 ± 0,01 ^a
F2- 4% ET-VLS	0,06 ± 0,01 ^a
F3- 5% ET-VLS	0,06 ± 0,02 ^a
F4- 6% ET-VLS	0,06 ± 0,01 ^a
F5- 7% ET-VLS	0,06 ± 0,01 ^a

Nota. ET-VLS: Extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet. Fuente: Elaboración propia.

Letras minúsculas diferentes en una misma columna indican diferencias significativas para cada tratamiento de extracto de totumo.

Aunque el método de evaporación de solventes y el disposición en cajas petri no produce necesariamente películas de espesor o densidad homogéneo, probablemente debido a desniveles del plano, de acuerdo con el análisis estadístico, la adición de extractos en diferentes concentraciones no afecta significativamente el espesor de las películas.

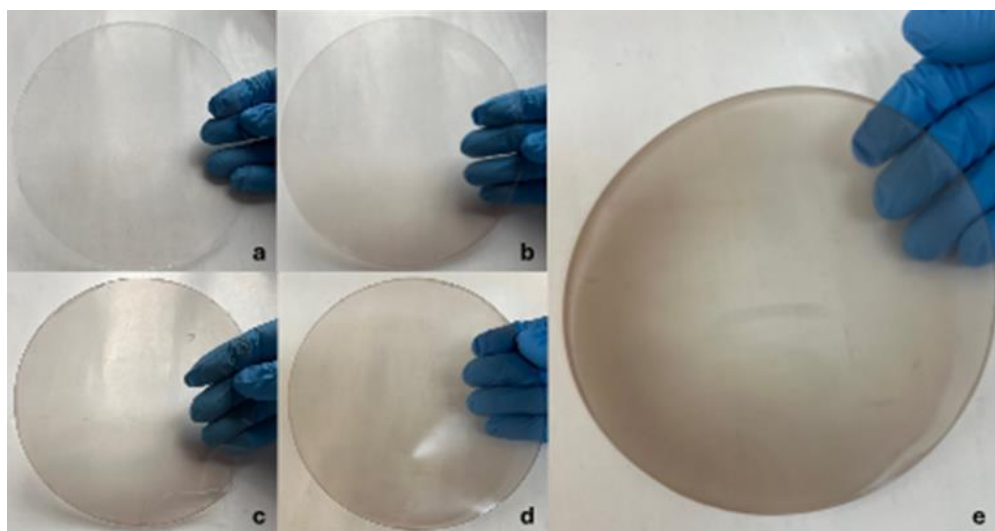
Color y Barrera a la Luz

Se evaluó el efecto de los extractos sobre las cualidades estéticas de las películas de degradación oral y su capacidad de ejercer resistencia al paso de la luz.

La figura 9 ilustra el cambio de tonalidad de las películas en función de una mayor concentración de extracto de totumo.

Figura 9

Aspecto visual de Películas de CMC y Gelatina con diferentes porcentajes de extracto de totumo



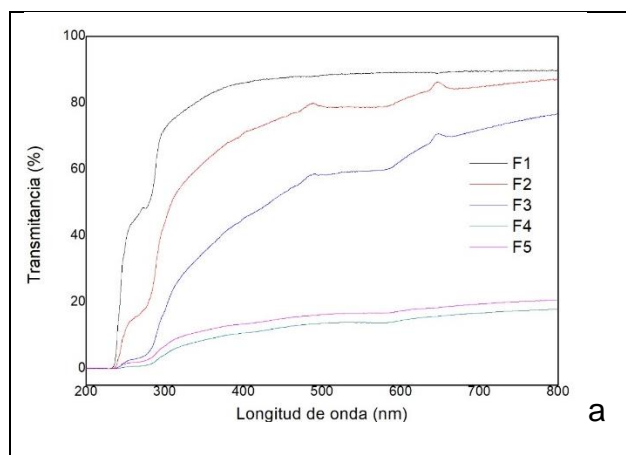
Nota. Películas de CMC y Gelatina con diferentes porcentajes de extracto de totumo. a. F1 0% ET; b. F2 4% ET-VLS; c. F3 5% ET-VLS; d.F4 6% ET-VLS; e. F5 7% ET-VLS. Laboratorio LIDA 2024. Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar, estas películas presentan superficies lisas y visualmente de tonalidad homogénea, sin material particulado o granular y su tonalidad se incrementa en la medida que se adiciona una mayor concentración de extracto.

La figura 10 ilustra la barrera a la luz UV-visible y FTIR de las diferentes películas, los valores son reportados como % de transmitancia.

Figura 10

Barrera a la luz UV-visible de películas funcionalizadas con extracto de totumo a diferentes porcentajes



Nota. Imagen de barrera a la luz UV-visible y FTIR de películas funcionalizadas con extracto de totumo a diferentes %. a UV-vis. F1 0% ET; F2 4% ET-VLS; F3 5% ET-VLS; F4 6% ET-VLS; F5 7% ET-VLS. Fuente: Elaboración propia

Al verificar el comportamiento de las películas en el espectro visible y en el infrarrojo, se logra identificar primero en el espectro UV-vis que en la medida que se incrementa la concentración de extracto en las películas, la transmitancia desciende debido a la concentración de cromóforos de los compuestos presentes en los extractos que absorben una mayor cantidad de luz radiante, implicando que la barrera (absorción) se incrementa a medida que se concentra el extracto en la película funcionalizada, que pueden ser verificados matemáticamente si se

considera que la absorbancia $A = -\log_{10}(T)$ o $A = \log_{10}(1/T)$, siendo T (transmitancia), entonces altos valores de transmitancia darán valores de absorbancia bajos y viceversa, dado que el valor T se ubica en el denominador de la ecuación, acercándonos de esta manera a una idea sobre la densidad óptica de las películas; por otro lado, al revisar las gráficas en el espectro infrarrojo mediante equipo FTIR que trabaja a mayores longitudes de onda, el cambio en la concentración de los extractos se manifiesta en forma de picos de porcentajes de transmitancia (fracción de radiación incidente que pasa a través de la muestra sin ser absorbidos) más altos a medida que se incrementa la concentración del extracto en la película implicando mayores absorbancias. Matemáticamente, este valor de transmitancia se calcula utilizando la ecuación $T = I/I_0$, donde I es la intensidad de la luz transmitida por el medio e I_0 es la intensidad de la luz incidente y el rango ($T\% = I/I_0 * 100$) varía entre el 0% (no hay transmisión) y el 100% (transmisión total); de tal manera que al considerarse en el numerador valores I (intensidad de luz transmitida por el medio) altos, respecto a los de la luz incidente inicialmente, dará como resultados valores de absorbancia bajos.

En conclusión, en el espectro ultravioleta las películas de degradación oral funcionalizadas con extracto de totumo muestran un descenso de la transmitancia a medida que incrementa la concentración, implicando incrementos de la absorbancia y la densidad óptica, mientras que en el espectro infrarrojo mayores concentraciones de extracto se expresan mediante picos de transmitancia altos.

Tiempo de Desintegración

La desintegración de las películas se determina por el tiempo de falla súbita o tiempo que demora la gota de agua en perforar la matriz biopolimérica.

La figura 11 muestra una gota agua desintegrando la película de desintegración oral

Figura 11

Prueba de desintegración.



Nota. Foto prueba de desintegración muestra una gota de agua sobre biopelícula durante test de desintegración. Laboratorio LIDA-UNAD 2024. Fuente: Elaboración propia

La tabla 8 muestra los datos de tiempo de desintegración de las películas en función de la formulación de las películas.

Tabla 8

Tiempo de desintegración de películas según formulación

Formulación	Tiempo de Desintegración en s \pm D.S.
F1 0% VLS	28,67 \pm 14,22 ^a
F2 4% VLS	25,97 \pm 14,22 ^a
F3 5% VLS	29,8 \pm 18,01 ^a
F4 6% VLS	45,8 \pm 6,92 ^{a, b}
F5 7% VLS	54,57 \pm 9,69 ^b

Nota. La tabla 8 muestra los datos de tiempo de desintegración de las películas en función de la formulación de las películas. F1 0% adición de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet; F2 4% adición de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet; F3 5% adición de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet; F4 6% adición de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet; F5 7% adición de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet. Fuente: Elaboración propia. Las letras diferentes a, b, indican diferencias significativas para cada formulación.

De acuerdo con el análisis estadístico del test de fisher la adición de extractos en las concentraciones estudiadas no presenta diferencias significativas en el tiempo de desintegración

para las formulaciones F1, F2 y F3, no obstante, a medida que se aumenta la cantidad de extracto adicionado a las películas al 6 y 7%, el tiempo de desintegración se incrementa, generando cambios significativos en el tiempo.

Dado que las películas no tienen un grosor estandar, se procedió a verificar de qué manera el grosor de las películas puede influir en el tiempo de desintegración de las películas.

La tabla 9 Presenta la relación entre el grosor de la película y el tiempo de desintegración en segundos.

Tabla 9

Tiempo de desintegración en función del grosor de las películas

Formulación	Grosor medio en mm \pm DS	Tiempo medio de desintegración en s \pm DS
F1-0%	0,05 \pm 0,020 ^a	28,67 \pm 14,22 ^a
F2-4%	0,05 \pm 0,003 ^a	25,97 \pm 14,22 ^a
F3-5%	0,05 \pm 0,010 ^a	29,8 \pm 18,01 ^{a, b}
F4-6%	0,06 \pm 0,010 ^{a, b}	42,2 \pm 4,24 ^{a, b}
F4-6%	0,07 \pm 0,000 ^{a, b}	53 \pm 0,00 ^{a, b}
F5-7%	0,08 \pm 0,010 ^{a, b}	54,57 \pm 9,69 ^b

Nota. Letras minúsculas diferentes a, b, indican diferencias significativas para cada formulación.

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con el análisis estadístico y la prueba de Fischer, el grosor de la película influye en el tiempo de desintegración de la película, por lo tanto, se puede deducir que la resistencia a la desintegración es directamente proporcional a la concentración de extracto adicionado y el grosor de las películas.

Contenido de Humedad y Solubilidad de las Películas de Degradación Oral

La humedad de películas se determinó por secado a 100°C por 24 horas hasta peso constante; la solubilidad de las películas se determinó como pérdida de peso porcentual considerado en la metodología y el grosor se determinó utilizando micrómetro digital Mitutoyo 0-12,5 mm.

La tabla 10 presenta la formulación, el grosor, porcentaje de humedad y solubilidad de las películas de degradación oral y las diferencias estadísticas con base en test de Fischer y un valor $p < 0,05$.

Tabla 10

Porcentaje de solubilidad películas

Formulación	Grosor	% Solubilidad \pm D.S.	% Humedad
F1 0% ET-VLS	0,05 \pm 0,008 ^{a, b}	61,09 \pm 14,10 ^a	15,15 \pm 0,32 ^b
F2 4% ET-VLS	0,06 \pm 0,007 ^c	47,19 \pm 2,27 ^b	11,03 \pm 1,12 ^a
F3 5% ET-VLS	0,06 \pm 0,011 ^{b, c}	47,62 \pm 1,23 ^b	12,87 \pm 1,26 ^{a, b}
F4 6% ET-VLS	0,04 \pm 0,006 ^a	45,42 \pm 6,41 ^b	12,62 \pm 2,66 ^{a, b}
F5 7% ET-VLS	0,05 \pm 0,006 ^{b, c}	48,16 \pm 1,62 ^b	13,5 \pm 1,11 ^{a, b}

Nota. ET-VLS: Extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet. Letras minúsculas en cada columna indican diferencias estadísticas significativas. Fuente. Elaboración propia

Al analizar el grosor, la solubilidad y el contenido de humedad de las películas de degradación oral (F1-0% ET-VLS) frente a las funcionalizadas, se deduce que la adición de extractos no influye en el grosor de las mismas, aspecto que ya con anterioridad se había estudiado de manera estadística; no obstante, si se aprecian diferencias estadísticas en la solubilidad y el contenido de humedad. Con respecto a la solubilidad, se debe considerar que los fenoles son compuestos polares, parecidos a los alcoholes, relativamente solubles en agua y aunque exhiben puentes de hidrógeno, constituyen un grupo químico diferente, tienen una proporción carbono y grupos funcionales -OH relativamente baja (6:1 en las moléculas más simples), no debiendo ser mayor de 3:1 para que la solubilización sea completa, razón por la cual, el proceso de extracción o solubilización de compuestos se realizaron con etanol, mientras que las películas se solubilizaron en agua, adicionalmente, la conformación de interacciones

moleculares del extracto con la red polimérica de la matriz (gelatina-CMC-sorbitol) influye en el proceso. Con relación al contenido de humedad, también se observan diferencias estadísticas entre las formulaciones F1-0% y F2-4% aunque no entre las formulaciones F1-0% y las formulaciones F5, F6 y F7 que tienen mayor adición de extracto, este efecto se puede deber al contenido de humedad (agua) presente en los extractos, pese al mayor contenido de sólidos que se presentes en los mismos.

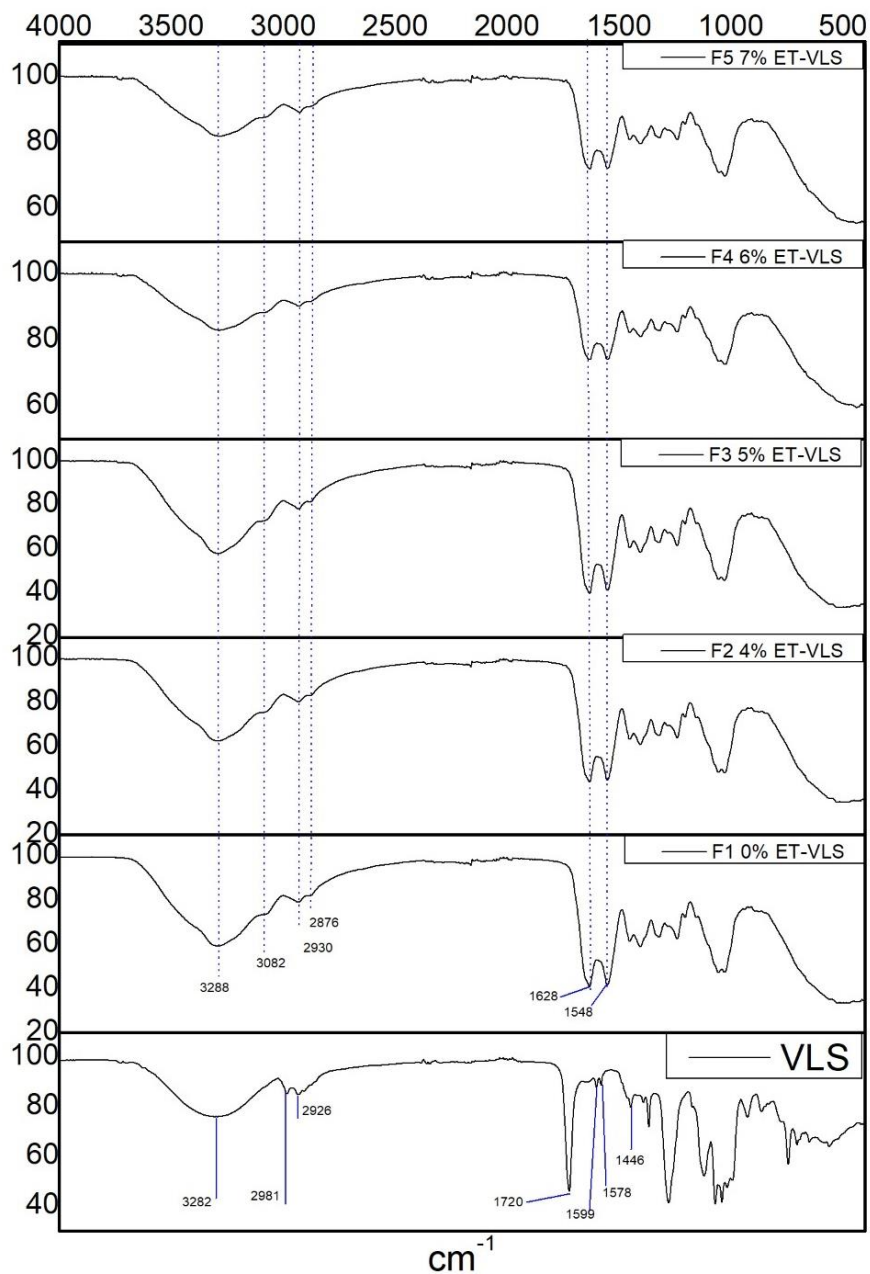
Análisis en el Infrarrojo (FTIR) de las Películas de Degradación Oral

El análisis de las bandas de las películas permite de manera cualitativa identificar enlaces y posibles grupos funcionales, la comparación entre las gráficas FTIR de la matriz polimérica sin y con adición de extracto, permiten diferenciar el efecto de la funcionalización de las películas.

A continuación, la figura 12 presenta las principales señales características determinadas a través de espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier FTIR/ATR del extracto de totumo VLS y las películas funcionalizadas en el rango de $4000-1500\text{ cm}^{-1}$

Figura 12

Espectros FTIR del extracto de totumo VLS y las películas funcionalizadas con las principales señales características



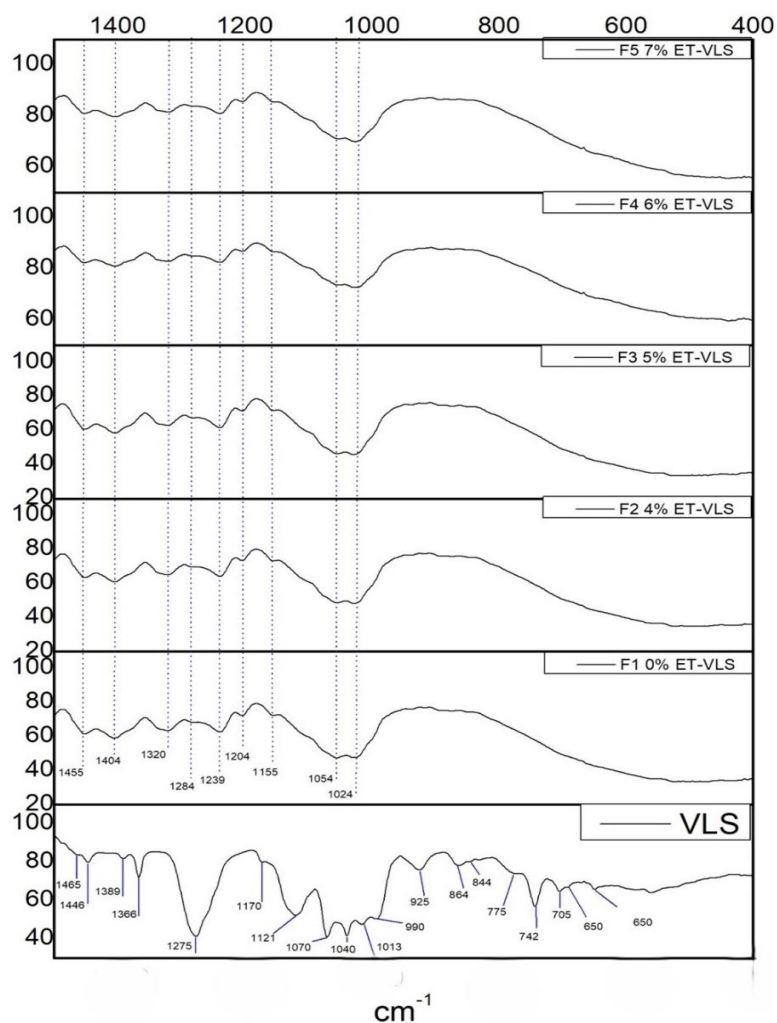
Nota. F1 0% VLS; F2 4% VLS; F3 5% VLS; F4 6% VLS; F5 7% VLS. Laboratorio LIDA

UNAD 2024. Fuente: Elaboración propia

La figura 13 presenta las principales señales características determinadas a través de espectrofotometría de infrarrojo con transformada de Fourier FTIR/ATR del extracto de totumo VLS y las películas funcionalizadas en el rango de 1500-400 cm^{-1}

Figura 13

Espectros FTIR del extracto de totumo VLS y las películas funcionalizadas con las principales señales características en el rango 1500 a 400 cm^{-1} .



Nota. F1 0% VLS; F2 4% VLS; F3 5% VLS; F4 6% VLS; F5 7%. Laboratorio LIDA UNAD

2024. Fuente: Elaboración propia.

La tabla 12 presenta las principales señales presentes en la estructura de las películas a base de gelatina tipo A, CMC y sorbitol, funcionalizadas con diferentes porcentajes de extracto de totumo.

Tabla 12

Principales señales de espectros FTIR de películas

Numero de onda en cm^{-1}	Tipo de señal	Tipo de enlace	Grupos funcionales
3280	Tensión	O-H y NH	Grupos alcohol y amida, formación de puentes de hidrógeno
3082	Vibraciones de tensión	C-H	Alquenos, vibraciones de tensión C-H Sp ²
2930-2876	Tensión	C-H	Alcanos C-H Sp ³
1628	Tensión	C=O	Amida I, representando los enlaces C=O de la gelatina, y al enlace de hidrógeno relacionados al COOH de la CMC.
1578	Balanceo y estiramiento	N-H y C-N; -COOH	Amida II de la gelatina. De igual forma, la amida II podría estar interactuando con el grupo -COOH de la CMC (Esteghlal et al., 2018).
1320	Estiramiento y balanceo	C-N; N-H	Amida III.
1284	Tensión	C-O	Ácidos carboxílicos
1239- 1204	Flexión	C-O	Aminas alifáticas
1154	Flexión	C-N	Alcoholes terciarios
1054	Tensión	C-O	Alcoholes primarios

Nota. La tabla 12 presenta Principales señales de espectros FTIR de películas F1 0% VLS; F2 4% VLS; F3 5% VLS; F4 6% VLS; F5 7% VLS. Fuente: Elaboración propia

Como se puede apreciar, algunos picos se mantienen, aunque variando su intensidad y otros desaparecen. El incremento en la intensidad de la transmitancia tras la adición de ET-VLS se debe probablemente a interacciones con los componentes poliméricos de la película o un solapamiento de picos con enlaces O-H identificados en la misma región; la adición de ET-VLS a las películas de Gelatina-CMC-Sorbitol favoreció la interacción molecular (estiramiento) en la región de enlaces -OH posiblemente debido a la cantidad de compuestos fenólicos presentes en el extracto (Tanwar et al., 2021). El incremento de la transmitancia en algunos picos

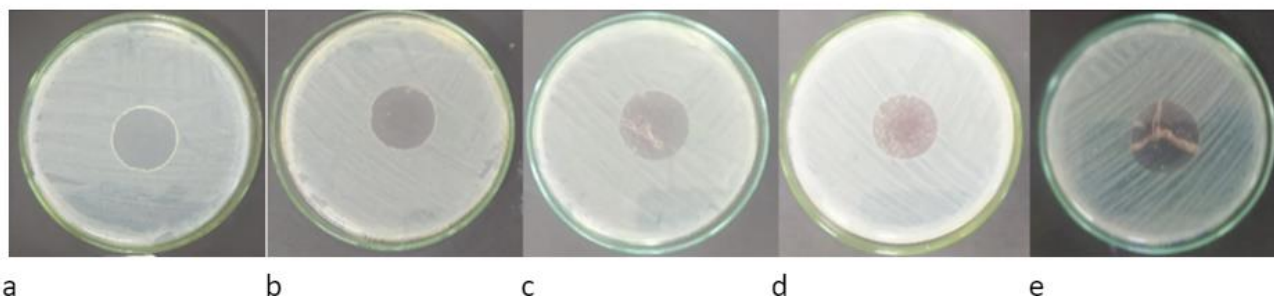
identificados en las películas adicionadas, podrían indicar que los componentes poliméricos utilizados podrían estar limitando/reduciendo la actividad de los fenoles y flavonoides presentes en el extracto de totumo.

Actividad Antimicrobiana

La figura 14 muestra las películas funcionalizadas con ET-VLS y su efecto inhibitorio sobre la cepa *E. coli*. Como se puede observar, la adición del extracto en la matriz biopolimérica no logró inhibir el crecimiento de *E.coli*, en concordancia con lo evidenciado por Chusnie y Cushnie, (2014); es probable que se deba adicionar una mayor cantidad de extracto a la matriz, para lograr actividad antimicrobiana de las películas.

Figura 14

Halos de inhibición películas funcionalizadas frente a E. coli.



Nota. Halos de inhibición películas funcionalizadas con diferentes porcentajes de extracto de totumo frente a *E. coli*. a. F1 0% ET; b. F2 4% ET-VLS; c. F3 5% ET-VLS; d.F4 6% ET-VLS; e. F5 7% ET-VLS. Fuente: Elaboración propia.

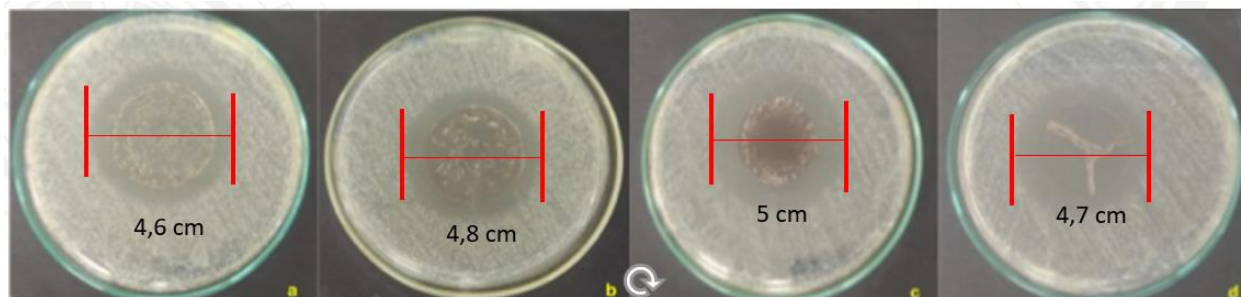
Posiblemente la respuesta negativa se deba a reacciones de acomplejamiento entre taninos y gelatina presente en la matriz biopolimérica y debido al ingreso de grupos hidroxilo fenólicos a las áreas hidrofóbicas de la gelatina, pudiendo generar complejos tanto solubles como insolubles dependiendo del tamaño de los taninos tal como lo ha descrito Yi, Cheng, & Xing, (2015) y posiblemente limitando que estos estén disponibles para la acción antimicrobiana.

Con relación al *Streptococcus mutans* se presentaron halos de inhibición de entre 4,6 y 5 cm respecto al diámetro de 2,5 cm de las películas utilizadas en el ensayo.

A continuación, la figura 15 muestra los halos de inhibición obtenidos a diferentes concentraciones.

Figura 15

Halos de inhibición películas funcionalizadas frente a S. mutans



Nota. La figura 17 muestra Halos de inhibición películas funcionalizadas con extracto de totumo Verde Liofilizado Soxhlet frente a *S. mutans*. a. F2 4% ET-VLS; b. F3 5% ET-VLS; c. F4 6% ET-VLS; d. F5 7% ET-VLS. Laboratório LIDA UNAD 2024. Fuente: Elaboración propia.

Los estreptococos son bacterias gram positivas con forma de coco, se estructuran en cadenas o en parejas, no manifiestan movimiento, no esporulan y tienden a cambiar su forma de coco a una más alargadas como bacilo. Uno de sus factores de virulencia se relaciona con su capacidad de fermentar azúcares para formar ácidos orgánicos, disminuir el pH atenuando la influencia de la acidificación incrementando la actividad de la F-ATPasa, que transporta protones fuera de la célula en asociación con la hidrólisis de Adenosina Trifosfato (ATP) para mantener pH en el medio intracelular más alcalino que en el medio extracelular (Abreu e Hidalgo, 2013). Es probable que este factor haya incidido en la degradación de polisacáridos del CMC presentes en la red tridimensional de la matriz polimérica permitiendo la liberación de

compuestos (saponinas o alcaloides) con capacidad de alterar la membrana celular del microorganismo y permitiendo la acción inhibitoria del extracto de totumo.

De acuerdo con Hasanah (2018) Las saponinas de origen natural pueden actuar como detergentes y degradar capa externa de lipopolisacáridos propia de las bacterias facilitando la posterior actuación de alcaloides que actúan permeabilizando las células e inhibiendo la bomba de flujo de las ATPasas. Por otro lado, Dasgupta y Mehta, (2023) reportó presencia de alcaloides a razón de $57,15 \pm 0,39$ mg/g de muestra y saponinas en un $17,0 \pm 0,35$ % en el fruto del totumo y Oluwafemi (2010) reportó la presencia de fenoles, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides además de cianuro de hidrógeno en el fruto de *Crescentia cujete* L.

Jácome et al., (2020) verificó un efecto antimicrobiano de hojas de Coité (*Crescentia cujete* L) similar a la clorhexidina para *S. mutans*, advirtiendo un campo de investigación para verificar su uso como solución intraoral en personas con alta actividad de caries dental que requieren el uso de antimicrobianos. La comparación del efecto del Coité con el digluconato de clorhexidina es importante, dado que este último es considerado el estándar como antimicrobiano para uso odontológico.

Salta a la vista como los factores de virulencia o características propias de las bacterias gram positivas *S. aureus* y *S. mutans*, posiblemente pueden influir en el efecto inhibitorio del extracto de totumo al igual que las posibles interacciones de acomplejamiento entre la gelatina que forma la matriz y los taninos presentes en el extracto tal como lo describe Yi, Cheng, & Xing, (2015), limitando posiblemente su efecto sobre bacterias gram negativas como la *E. coli*. no obstante, haría falta realizar pruebas para determinar si este fenómeno se reproduce en el caso de los taninos presentes en el extracto de totumo. Por otro lado, se ha reportado que la adición de sorbitol influye en la estabilidad estructural de las matrices poliméricas e interviniendo en la

difusividad de compuestos encapsulados y disminuyendo la temperatura de transición vítrea de la película, Díaz-Calderon et al., (2015), elemento que podría ser objeto de futuros estudios a fin de establecer las implicaciones de la adición o disminución de este plastificante en la estructura de la matriz y la difusividad de los extractos.

Contenido de Fenoles Totales de las Películas de Degradación Oral

La tabla 13 presenta las concentraciones de fenoles totales en las películas funcionalizadas determinado mediante proceso colorimétrico.

Tabla 1

Fenoles totales presentes en películas adicionadas con extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxhlet en diferentes concentraciones

Fenoles totales en películas		
Formulación	% E.T.VLS	mg GAE/ g película
F1	0%	0,00 ± 0,00 ^a
F2	4%	0,05 ± 0,04 ^b
F3	5%	0,04 ± 0,04 ^b
F4	6%	0,44 ± 0,04 ^c
F5	7%	0,63 ± 0,04 ^d

Nota. La tabla 13 presenta las concentraciones de fenoles totales expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo de película (mg GAE / g película). Letras minúsculas en cada columna indican diferencias estadísticas significativas. Fuente: Elaboración propia.

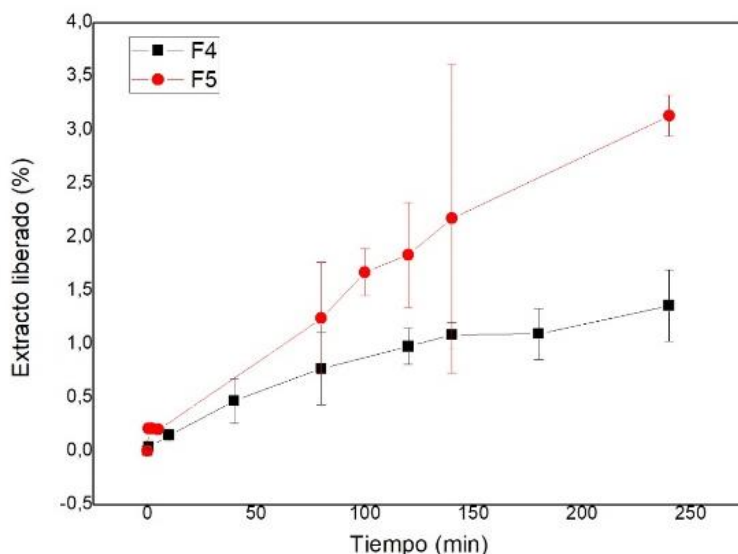
El contenido de fenoles totales aumenta con el incremento de las dosificaciones, no obstante, son inferiores a los contenidos de los extractos que para la muestra Verde-Liofilizado-Soxhlet (VLS) fue de 4,7 mg GAE/ g extracto.

Liberación In Vitro de Películas de Degradación Oral

La figura 16 muestra el porcentaje de extracto liberado por las películas F4 y F5 en función del tiempo.

Figura 16

Perfil de liberación fenoles en películas F4 y F5



Nota. La figura 16 presenta el perfil de liberación de fenoles de las películas identificadas como F4 6% de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxlhet y F5 7% de extracto de totumo Verde-Liofilizado-Soxlhet. Laboratorio LIDA UNAD 2024. Fuente: Elaboración propia.

La gráfica del perfil permite observar un mayor porcentaje de liberación de compuestos en la medida que incrementa la concentración de extractos adicionados, durante un lapso de tiempo definido. Adicionalmente se contempla tres momentos en dicha liberación; inicialmente sucede de manera rápida; luego la pendiente cae y posteriormente vuelve a incrementarse de manera constante; esto se debe probablemente a que en un primer momento, la matriz polimérica no ha generado una capa de hidrogel y el extracto próximo a la superficie se libera de manera rápida, posteriormente y en la medida que el agua ingresa en la matriz, genera hinchamiento, el límite de contacto se mueve y la liberación se ralentiza, mientras el sistema llega una tercera fase en la cual el transporte entre las capas internas externas se reorganiza y el gradiente de concentración permite una velocidad de difusión constante. Definir los perfiles y velocidades de

liberación tienen gran importancia a nivel farmacocinético, ya que se debe hacer coincidir estos con los requisitos fisiológicos y crono-terapéuticos necesarios para lograr los efectos deseados.

Cinética de Liberación en Películas de Degradación Oral

La tabla 14 presenta la cinética de liberación de acuerdo con diferentes modelos que explican el proceso.

Tabla 14

Cinética de liberación de fenoles

Formulación	Modelo cinético	R ²	k	N
F4 VLS	Orden cero	0,9307	6,0*10 ⁻⁵	Na
	Primer orden	0,9314	6,0*10 ⁻⁵	Na
	Higuchi	0,9884	0,0009	Na
	Korsmeyer-Peppas	0,9861	0,0005	0,5992
	Hixon-Crowell	0,9312	2,0*10 ⁻⁵	Na
F5 VLS	Orden cero	0,986	0,0001	Na
	Primer orden	0,9869	0,0001	Na
	Higuchi	0,9684	0,0019	Na
	Korsmeyer-Peppas	0,9175	0,0017	0,4849
	Hixon-Crowell	0,9866	4,0*10 ⁻⁵	Na

Nota. La tabla 14 presenta los valores de correlación R², coeficientes de difusión y valor del exponente **n** para el modelo Korsmeyer-Peppas. Fuente: Elaboración propia.

La cinética de liberación de compuestos hace referencia a la velocidad con que se entrega un fármaco en un sistema y se entiende como una transferencia de masa que se produce en la medida que la matriz polimérica conformada por sustancias supramoleculares anfitrionas (gelatina-CMC- sorbitol) soluble se humedece, hincha y genera una capa de hidrogel que controla el ingreso de agua al interior de la matriz y permite la difusión del extracto de totumo (sustancia huésped) hacia el exterior. Este proceso se lleva a cabo mediante un modelado de liberación de principios activos que se dispersan mediante límites móviles. Por lo tanto, la velocidad de difusión podría ser modulada variando los componentes de la matriz tal y como por

ejemplo anteriormente lo había referido Díaz-Calderón et al., (2015) en relación con el sorbitol que cumpliría en este caso el papel de surfactante dentro de la estructura polimérica.

Como se puede observar, en el caso de la biopelícula F4, el modelo matemático que mejor explica la cinética de liberación es el de Higuchi, donde la cinética de liberación del extracto está regida por sus propiedades físicas, en especial por su peso molecular y solubilidad tanto en la matriz polimérica como en agua; por la cantidad de extracto incorporado en la matriz y por la geometría de esta, mientras que la velocidad de liberación cae gradualmente, dependiendo del gradiente del área superficial y la densidad de la película mientras que si hay suficiente extracto para mantener el gradiente de concentración, la velocidad de difusión a través de la membrana se mantendrá constante. En el proceso, el solvente (saliva o solución) hincha paulatinamente la película de degradación, generando una capa límite de hidrogel que presenta inicialmente resistencia a la transferencia de masa y la difusión a través de la matriz no puede ser explicada por la ley de Fick dado que, en este caso la velocidad de difusión no solo depende de la concentración del extracto. En este sentido, Higuchi propone que la fracción de extracto liberado en cada punto de tiempo (M_t/M_∞) es equivalente al producto entre (KH) constante de disolución de Higuchi (que reúne la solubilidad y el coeficiente de difusión del fármaco en la matriz) y la raíz cuadrada del tiempo ($t^{1/2}$).

En cuanto a la cinética de liberación de la película F5 con mayor contenido de extracto, evidencia como este influye la cinética y, por lo tanto, el modelo matemático de primer orden explica de mejor manera el proceso de difusión. En virtud de ello, la liberación es directamente proporcional a la concentración de extracto y la velocidad de disolución disminuye con el tiempo. Esto se debe posiblemente a que la relación entre la concentración de extracto-composición supramolecular de la matriz polimérica genera inestabilidades en los puentes de

hidrógeno durante el proceso de disolución. Es probable que los espacios de inclusión de la matriz estén más saturados de extracto generando en la arquitectura del sistema condiciones límite cambiantes que dificultan mantener estables dichas uniones de manera tal que al inicio de la difusión y en presencia de solvente hay una mayor disponibilidad de principios activos que debido al gradiente de concentración se dispersan a mayor velocidad en el medio. En este sentido, aunque la transferencia a través de la membrana de un espesor (L) está determinada por los límites que cambian con el tiempo durante el hinchamiento y el flujo que entra y sale de estos, siendo mayor el intercambio al inicio del proceso debido al gradiente de concentración (Mircio C. et al 2019)

Conclusiones

El proceso de liofilización de la pulpa, permite obtener extractos con mayor contenido de compuestos en relación a los obtenidos a partir de pulpa fresca tal y como se evidencia en la cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides; de igual manera, las lecturas de las principales señales características de los espectros FTIR en la región de los enlaces O-H centrados alrededor de los 3280 cm^{-1} son menos intensas en los extractos liofilizados que en los frescos, probablemente a una menor cantidad de agua o enlaces (H-OH).

Este mayor contenido de compuestos también fue influenciado por la técnica de extracción, siendo el soxhlet la que presentó más eficiencia frente a técnicas como el ultrasonido o agitación que se realizan a menor temperatura; adicionalmente, al comparar los métodos de extracción en las lecturas de señales FTIR se observa que el soxhlet ofrece un mayor grado de extracción que se aprecia no solo en el número de bandas, sino también en la definición e intensidad de las mismas.

Aunque los extractos de totumo provenientes de frutos verdes y maduros sometidos a método de extracción soxhlet presentan cantidades similares de fenoles, expresados como equivalentes de ácido gálico por miligramo, el contenido de flavonoides de los extractos verdes liofilizados es mayor que los provenientes de frutos maduros.

El extracto de totumo identificado como Verde-Liofilizado-Soxhlet presentó capacidad antioxidante $EC_{50} = 188,91 \pm 0,41\ \mu\text{g/ml}$ frente al radical DPPH[•] que puede ser baja si se compara frente al estándar trolox que presentó una de $EC_{50}=2,95\ \mu\text{g/ml}$ implicando que, aunque el extracto tiene capacidad antioxidante, su eficiencia no es mayor que el patrón de comparación utilizado.

En general, todos los extractos tuvieron actividad antimicrobiana frente a *S. mutans*, mientras que frente a *S. aureus* los extractos no mostraron mayor actividad. Con relación a *E. coli*, el extracto de totumo VLS alcanzó en promedio halos de inhibición de $10,83 \pm 2,59$ y el extracto VFU presentó mayor actividad frente al *S. mutans* con valores de $8,83 \pm 1,18$ mm teniendo como referencia difusión en discos de 6 mm de diámetro. Aunque en principio se podría considerar que estos resultados indicarían una baja o nula capacidad antimicrobiana para un extracto natural, sería importante analizar si el uso de extractos más concentrados refiere los mismos u otros resultados.

La adición de extractos a las películas no mostró diferencias estadísticamente significativas en el espesor y contenido de humedad frente a la película de control; por otro lado, su opacidad sí se presentó diferencias apreciables no solo a simple vista sino también al ser sometidas a análisis espectrofotométrico UV/Visible, presentando mayor barrera a la luz a medida que se incrementó la concentración de extracto.

Si bien, la composición polimérica de la película confiere a la estructura cierta resistencia a la desintegración, estadísticamente, este también se ve influenciado por dos variables, el grosor de la película y el incremento en la concentración de los extractos, esto implica una interacción entre los compuestos del extracto y las macromoléculas empleadas en la fabricación de las películas y el sorbitol empleado en la plastificación.

Esta interacción molecular matriz-extracto, limitó el efecto antimicrobiano frente a *E. coli*, mientras que para el caso de *S. mutans* presentó halos de inhibición de hasta 5 cm teniendo como referencia discos funcionalizados con extracto de totumo VLS entre el 4 y el 7%.

El perfil de liberación de compuestos establece que, a mayor concentración, mayor porcentaje de liberación en un mismo rango de tiempo, mientras que la cinética nos indica que la

liberación está mediada no solo por la concentración de los extractos adicionados sino por fenómenos fisicoquímicos que se producen en la medida que la matriz polimérica formada por supra moléculas con capacidad de organizarse estructuralmente mediante enlaces intermoleculares se humecta, hincha y genera una capa de hidrogel que controla el ingreso de agua al interior de la matriz modulando la transferencia del extracto de totumo hacia el exterior, es decir, ofreciendo cierta resistencia a la difusión, por la relación superficie-volumen y el tiempo de exposición a humedad para que la matriz inicie el proceso de desintegración, disgregación y difusión.

La matriz polimérica es una red formada por una gelatina (proteína) que presenta entre otros, grupos funcionales carboxilo (COOH), mientras que la CMC es un polisacárido que tiene grupos hidroxilo (OH) al igual que el sorbitol, generando fuerzas intermoleculares y a la formación de puentes de hidrógeno y otras interacciones con capacidad de generar un gel estable que permite encapsular agua y principios activos presentes en los extractos. Para la formación de este gel, se hace necesario proporcionar temperatura al sistema, de tal manera que se rompan las fuerzas de atracción entre los componentes puros y se dé lugar a la formación de nuevas uniones intermoleculares que al enfriarse se estabilizan formando la red gelificada.

Recomendaciones

El presente trabajo ha mostrado que los extractos de totumo VLS tienen potencialidad para inhibir *S. mutans*, esta bacteria con *sus c, e y f, sanguis, sobrinus y cricetus* está asociada a la presencia de caries debido a su capacidad de variación morfológica de acuerdo al pH del medio, fermentar polisacáridos, producir ácidos y generar desmineralización dental por la pérdida de calcio entre otros. Adicionalmente el *S. mutans* ha sido asociado a casos de endocarditis infecciosa, enfermedad séptica que causa masas bacterianas en las válvulas cardíacas, causando diversos síntomas debido a la insuficiencia. También puede causar bacteriemias y se ha relacionado un caso de infección de prótesis articular debido probablemente a su capacidad de migrar desde la cavidad bucal alcanzando el corriente sanguíneo cuando se produce pulpitis. Por lo tanto, se podría considerar realizar más estudios que permitan identificar los compuestos que intervienen en la inhibición de esta cepa y determinar cuál sería la concentración mínima inhibitoria (CIM) a fin de explorar oportunidades como antibiótico alternativo a la clorhexidina que es el medicamento utilizado por excelencia en el ámbito odontológico y prevenir otras patologías derivadas de la movilidad de este microorganismo a otros órganos y tejidos.

Con relación a la matriz polimérica, el estudio demostró interacción molecular entre esta y los compuestos del totumo pueden limitar de alguna manera su acción antimicrobiana, por lo tanto, se hace necesario realizar estudios adicionales que permitan establecer si se puede elaborar una película que mejore las condiciones actuales de perfil de liberación.

Referencias bibliográficas

- Abreu E Gispert, Hidalgo N Nasco. Caracterización de la caries dental. En: González Naya G, Montero del Castillo ME, editores. Estomatología General Integral. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2013. p.55-67.
- Acofarma. Ficha de información técnica. Carboximetil celulosa sódica.
<https://formulasmagistrales.acofarma.com/idb/descarga/3/f921caa6b2011bfc.pdf>
- AOAC (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical chemists. 15th Edn. Washington D.C
- Arabski, M., Węgierek-Ciuk, A., Czerwonka, G., Lankoff, A., & Kaca, W. (2012). Effects of saponins against clinical E. coli strains and eukaryotic cell line. Journal of biomedicine & biotechnology, 2012, 286216. <https://doi.org/10.1155/2012/286216>
- Bala, R., Khanna, S., Pawar, P., & Arora, S. (2013). Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. International Journal of Pharmaceutical Investigation, 3(2), 67. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.114897>
- Barbosa Silva, J. (2019). BLENDDAS DE CARBOXIMETILCELULOSE E PECTINA DE BAIXA METOXILAÇÃO PARA OBTENÇÃO DE FILMES. Anais Dos Seminários de Iniciação Científica, 22. <https://doi.org/10.13102/semic.v0i22.4198>
- Bhat KP, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. Ann N Y Acad Sci 2002;957:210–29. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02918.x>
- Bergo, P et ál. Physical properties of edible films based on cassava starch as affected by the plasticizer concentration. Packaging Technology and Science, 2008, vol. 21, núm. 2, pp. 85-89.

- Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res* 1998;24:133–8. PMID: 9825229
- Billacura, Merell & Caezar, Glenn & Laciapag, R. (2017). PHYTOCHEMICAL SCREENING, CYTOTOXICITY, ANTIOXIDANT, AND ANTHELMINTIC PROPERTY OF THE VARIOUS EXTRACTS FROM *Crescentia cujete* Linn. FRUIT. *Science International-Lahore*. 29. 31-35.
- Bodini, R. B., Guimarães, J. das G. L., Monaco-Lourenço, C. A., & Aparecida de Carvalho, R. (2019). Effect of starch and hydroxypropyl methylcellulose polymers on the properties of orally disintegrating films. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 51, 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.03.028>
- Bodini, R. B., Sobral, P. J. A., Favaro-Trindade, C. S., & Carvalho, R. A. (2013). Properties of gelatin-based films with added ethanol–propolis extract. *LWT - Food Science and Technology*, 51(1), 104–110. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.10.013>
- Boluda, C. J., Duque, B., Gulyas, G., Aragón, Z., Duque, A., Diez, F., & de Tenerife, C. (2005). Lignanos (2): actividad farmacológica. *Revista de Fitoterapia*, 5(2), 135-147.
- Borges, J. G. (2017). Incorporação de compostos ativos naturais em matrizes poliméricas para liberação oral utilizando a técnica de impressão. Tese de Doutorado, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga. doi:10.11606/T.74.2017.tde-23112017-111327. Recuperado em 2024-06-05, de www.teses.usp.br
- Bors W, Heller W, Christa M y cols. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods Enzymol*, 1990, 186:343-355.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Britton G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 9(15), 1551–1558.
- Cáceres A., (1996), *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*, Editorial Universitaria, Universidad de San Carlos de Guatemala, pp. 273-275
- Cárdenas López, Dairon; Arias García, Juan Carlos; López Camacho, René *Árboles y arbustos de la ciudad de Leticia / Dairon Cárdenas López, Juan Carlos Arias García, René López Camacho*. Bogotá, D.C.: Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI, 2004 120 p.
- Chusnie T P, Cushnie B and Lamb A J 2014 *Int. J. Antimicrob. Agents* 44 377-378
- Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric* 1999;79:362–72
- Clifford MN, Scalbert A. Ellagitannins—occurrence in food, bioavailability and cancer prevention. *J Food Sci Agric* 2000;80:1118–25. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<1118::AID-JSFA570>3.0.CO;2-9)
- D. M. P. De Oliveira et al., “Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 33, no. 3, pp. 1–49, 2020, doi: 10.1128/CMR.00181-19.
- Das et al. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2014, 14:45
<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/14/45>

- Dasgupta, Sumita & Mehta, Zankhna. (2023). Qualitative and quantitative estimation of bioactive secondary metabolites present in fruit extracts of *Crescentia cujete*. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 11. 25-30.
<https://www.researchgate.net/publication/371902860> Qualitative and quantitative estimation of bioactive secondary metabolites present in fruit extracts of *Crescentia cujete*
- Declaration of Astana. Global conference on primary health care. Astana Kazakhtan 25-26 october 2018. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/328123/WHO-HIS-SDS-2018.61-eng.pdf?sequence=1>
- DENG, L.; KANG, X.; LIU, Y.; FENG, F.; ZHANG, H. Characterization of gelatin/zein films fabricated by electrospinning vs solvent casting. *Food Hydrocolloids*, v. 74, p. 324-332, 2018. Pages 324-332, ISSN 0268-005X, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.08.023>
- Dixit, R. P., & Puthli, S. P. (2009). Oral strip technology: Overview and future potential. *Journal of Controlled Release*, 139(2), 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.014>
- Dziedzic S.Z. and Hudson, B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*. 1984, 14: 45-51.
- Ejelonu, B. C., Oluwafemi, A. D., Lasisi, A. A., Olaremu, A. G., & Ejelonu, O. C. (2011). The chemical constituents of calabash (*Crescentia cujete*). *African Journal of Biotechnology*, 10(84), 19631–19636. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1518>
- El Aziz, MMA, Ashour, AS y Melad, ASG (2019). Una revisión sobre las saponinas de plantas medicinales: química, aislamiento y determinación. *J. Nanomed. Res*, 8 (1), 282-288.
- Espitia-Baena, Jorge Eliecer, Duran-Sandoval, Harriette del Rosario, Fandiño-Franky, Jaime, Díaz-Castillo, Fredyc, & Gómez-Estrada, Harold Alberto. (2011). *Química y biología del*

- extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L. (totumo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 337-346. Recuperado en 07 de junio de 2024, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000400005&lng=es&tlng=es.
- Fernández Cervera, M., Karjalainen, M., Airaksinen, S., Rantanen, J., Krogars, K., Heinämäki, J., et al. (2004). Physical stability and moisture sorption of aqueous chitosan–amylose starch films plasticized with polyols. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 69–76.
- Flórez, E. J. (2012). Evaluación de pulpa de totumo (*Crescentia cujete* L. L) ensilada en dos estados de maduración como alternativa en alimentación bovina. *Temas Agrarios*, 17, 44–51. <https://doi.org/10.21897/rta.v17i1.695>
- Gontard, N.; guilbert, S.; CUQ, J. L. Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film. *Journal of Food Science*, vol. 58, n. 1, p. 206-211, 1993.
- Goszcz, K., Deakin, S. J., Duthie, G. G., Stewart, D., Leslie, S. J., & Megson, I. L. (2015). Antioxidants in Cardiovascular Therapy: Panacea or False Hope? *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2015.00029>
- González, K.L., Gutierrez, R., Hernandez, Y., Valdes-Iglesias, O., Rodriguez, M. (2016). Determination of the antioxidant capacity of two seagrass species according to the extraction method. *J Pharm Pharmacogn Res.*, 4(5), 199-205.
- Gonzales, A. L., Sevilla, U. T. A., & Tsai, P. W. (2023). Pharmacological Activities of Bioactive Compounds from *Crescentia cujete* L. Plant – A Review. In *Biointerface Research in Applied Chemistry* (Vol. 13, Issue 2).

[https://doi.org/10.33263/BRIAC132.197Greenwood 1995 Antibiotics, Susceptibility \(Sensitivity\) Test Antimicrobial and Chemoterapy \(New York: Mc Graw Hill Company\)](https://doi.org/10.33263/BRIAC132.197Greenwood 1995 Antibiotics, Susceptibility (Sensitivity) Test Antimicrobial and Chemoterapy (New York: Mc Graw Hill Company))

Gutierrez V. Ms. Mary Anne (2022). Antioxidant Activity of The Terpenoid – Phenol Extract of *Crescentia Cujete*, Family Bignoniaceae. INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED MULTIDISCIPLINARY STUDIES IJAMS Volume II, Issue 7 July 2022, eissn: 2799-0664. <https://www.ijams-bbp.net/wp-content/uploads/2022/08/IJAMS-JULY-ISSUE-132-143.pdf>

Harborne JB (1973). *Phytochemical Methods* Chapman and Hall, London. pp. 110-113

Hasanah, Uswatun & Widhiastuti, HT & Suminto, Syaefudin. (2018). Potency of Ethanol Extract from *Berenuk* (*Crescentia cujete* L.) Fruit Rind and Flesh as Antibacterial Agents. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 187. 012001. 10.1088/1755-1315/187/1/012001.

Hassanpour, S., MaheriSis, N. y Eshratkiah, B. (2011). Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. *International Journal of Forest, Soil and Erosion*, 47-53.

Hawley, Gessner G et al. *Hawley diccionario de química : y de productos químicos*. ed. Totalmente revisasasa y ampliada. Barcelona: Omega, 1985. Print.

Heinemann, R. J. B., Carvalho, R. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2013). Orally disintegrating film (ODF) for delivery of probiotics in the oral cavity — Development of a novel product for oral health. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.04.009>

Henning, C. P. (n.d.). Capítulo 2 compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides.

- Insuasty-Santacruz, E., Apráez-Guerrero, E., & Gálvez-Cerón, A. (2013). Caracterización botánica, nutricional y fenológica de especies arbóreas y arbustivas de bosque muy seco tropical. *Revista Ciencia Animal*, 6.
- Jacob, M. C., Favre, M., & Bensa, J. C. (1991). Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry*, 12(6), 550–558.
<https://doi.org/10.1002/cyto.990120612>
- Jácome E. V. M., Bessa M. S. de, Melo M. C. N. de, Pessoa D. M. da V., Santos M. M. dos, Moura J. M. B. de O., & Almeida G. C. M. de. (2020). Atividade antibacteriana de extratos hidroalcoólicos de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) e *Crescentia cujete* (coité) em *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 12(10), e4787. <https://doi.org/10.25248/reas.e4787.2020>
- Juang, Y. P., & Liang, P. H. (2020). Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(21), 4974.
<https://doi.org/10.3390/molecules25214974>
- Kaneko T., Ohtani K., Kassai R., Yamasaki K. y Minh Duc N., (1997), Iridoids and iridoid glucosides from fruits of *Crescentia cujete*, *Phytochem.*, 46, 907-910.
- Kaneko, T., Ohtani, K., Kasai, R., Yamasaki, K., & Nguyen Minh, D. (1998). n-Alkyl glycosides and p-hydroxybenzoyloxy glucose from fruits of *Crescentia cujete* L.. *Phytochemistry*, 47(2), 259–263. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00409-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00409-3)
- Khanittha, M., La-ong, S., Tanyaporn, W., & Wilasinee, K. (2017). Tannin Extraction from Mangosteen Peel for Protein Precipitation in Wine. Recuperado de <https://www.semanticscholar.org/paper/Tannin-extractionfrom-mangosteen-peel-for-protein-Moosophon/7442365ca437c67e0b8aa498257b37c05f6c7aa3>

- Kozubek a. And tyman j.h.p. (1999). Resorcinolic lipids, the natural non-isoprenoid phenolic amphiphiles and their biological activity, *Chemical Reviews*. 1999, 99: 1-26.
- Kumari, M. y Jain, S. (2012). Tannins: An antinutrient with positive effect to manage diabetes. *Research Journal of Recent Sciences*, 2277, 2502.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., & Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*, 84(3), 329–339.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00216-4)
- L. Hall-Stoodley, J. W. Costerton, and P. Stoodley, “Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, no. 2, pp. 95–108, 2004, doi: 10.1038/nrmicro821.
- L. Wang, L. Liu, J. Holmes, J. Kerry and J. Kerry, *J. Food Sci. Technol.* 42, 1128 (2007).
- Lam, J. K. W., Xu, Y., Worsley, A., & Wong, I. C. K. (2014). Oral transmucosal drug delivery for pediatric use.
- Li H. Application of ultrasonic technique for extracting chlorogenic acid from *Eucommia ulmoides* Oliv. (*E. ulmoides*). *Ultrason Sonochem.* 2005;12:295-300.
- López M., L. G., Rada M., D. F., Góngora D., A. F., Morales M., L. C., & Ospina L., M. C. (2022). Evaluación de la extracción del colorante de totumo (*Crescentia cujete* L.) en un producto textil. *TecnoLógicas*, 25(53). <https://doi.org/10.22430/22565337.2165>
- Louie, K. B., Kosina, S. M., Hu, Y., Otani, H., de Raad, M., Kuftin, A. N., ... & Northen, T. R. (2020). *Mass Spectrometry for Natural Product Discovery*
- Lustosa, S. R. (2007). Padornização de extrato de própolis e avaliação de atividade antimicrobiana. Universidade Federal de Pernambuco.

- Ma, D., Aleixandre De Artiñano, A., Carreras, L., Miguel, ;, & Aleixandre, ; (2012). Artículo de Revisión Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud Beneficial health properties of iridoids terpenes. In *Nutr. clín. diet. hosp* (Vol. 32, Issue 3).
- Malanovic, N., & Lohner, K. (2016). Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta*, 1858(5), 936–946. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.11.004>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C. y Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. J., & Jesús Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes Correspondencia. *Nutr. Hosp*, 6, 271–278.
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220–227. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.06.011>
- Meléndez-Martínez, Antonio J., Vicario, Isabel M., & Heredia, Francisco J. (2004). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54(2), 209-215. Recuperado en 13 de junio de 2024, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222004000200011&Ing=es&tIng=es.
- Meléndez-Martínez, Antonio J., Vicario, Isabel M., & Heredia, Francisco J. (2007). Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 57(2), 109-117. Recuperado en 13 de junio de 2024, de

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222007000200002&lng=es&tlng=es.

Méndez, A., Martín-Martínez, S., & -Ortíz, R. (n.d.). Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba.

Mengying He, Ting Wu, Siyi Pan, Xiaoyun Xu, Antimicrobial mechanism of flavonoids against *Escherichia coli* ATCC 25922 by model membrane study, *Applied Surface Science*, Volume 305, 2014, Pages 515-521, ISSN 0169-4332, <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.03.125>.

Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, 85(2), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.05.007>

Milipore. Ficha de datos de seguridad. Carboxymethylcellulose, Sodium Salt, High Viscosity. https://www.merckmillipore.com/CO/es/product/msds/EMD_BIO-217274?Origin=PDP

Missouri Botanical Garden., (11-2007), <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>.

Mircioiu C, Voicu V, Anuta V, Tudose A, Celia C, Paolino D, Fresta M, Sandulovici R, Mircioiu I. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics*. 2019 Mar 21;11(3):140. doi: 10.3390/pharmaceutics11030140. PMID: 30901930; PMCID: PMC6471682.

Murgueitio, E. y Ibrahim, M. 2004. Conferencia Agroforestería, Ganadería y medio ambiente en américa latina, XII congreso venezolano de producción e industria animal p190-192.

Narváez Ortiz Yohana (2010) Composición química y toxicológica preliminar de la torta de la semilla de totumo (*Crescentia Cujete* L) cultivado en el departamento del Cauca.

Universidad del Cauca. Facultad de ciencias naturales, exactas y de la educación
departamento de química. Popayán 2010.

<http://repositorio.unicauca.edu.co:8080/bitstream/handle/123456789/7279/Composici%C3%B3n%20qu%C3%ADmica%20y%20toxicol%C3%B3gica%20preliminar%20de%20la%20torta%20de%20la%20semilla%20del%20fruto%20de%20totumo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

NCCLS. (1999). National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for
determining bacterial activity of antimicrobial agents.

Ninan G, Joseph J, Aliyamveetil ZA. 2010. Physical, mechanical, and barrier properties of carp
and mammalian skin gelatin films. *J Food Sci* 75: E620-E626. doi: 10.1111/j.1750-
3841.2010.01851.x.

Oliveira, K. A. de M., Oliveira, G. V. de, Batalini, C., Rosalem, J. A., & Ribeiro, L. S. (2013).
Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes
extratos de Própolis. *Semina: Ciências Biológicas E Da Saúde*, 33(2), 211–222.
<https://doi.org/10.5433/1679-0367.2012v33n2p211>

Olsen, D., Yang, Ch., Bodo, M., Chang, R., Leigh, S., Báez, J., Carmichael, D., Perea, M.,
Hamalainen, E., Jarvinen, M., and Polarek, J. (2003). Recombinant collagen and gelatin
for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 (12): 1547-1567.

Oluwafemi, Ayomide. (2010). A study of the phytochemical constituents, nutritive and anti-
nutritive values of calabash (*Crescentia Cujete*) FRUIT. 10.13140/RG.2.2.13908.76165.

OMS. Medicina Tradicional. [https://www.who.int/es/news-room/questions-and-
answers/item/traditional-](https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/traditional-)

- and Agricultural Biotechnology, Volume 11, 2017, Pages 75-82, ISSN 1878-8181, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.004>.
- Rahmaningsih, S., & Pujiastutik, H. (2019). An in vitro and in silico evaluation of the antibacterial activity of the bioactive compounds in Majapahit (*Crescentia cujete* L.) fruit. *Veterinary World*, 12(12). <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1959-1965>
- Rao, A. V., & Gurfinkel, D. M. (2000). The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. *Drug metabolism and drug interactions*, 17(1-4), 211–235. <https://doi.org/10.1515/dmdi.2000.17.1-4.211>
- Resta, V. G., & Mali, S. (2019). EFEITO DE SACAROSE E GLICEROL COMO PLASTIFICANTES EM FILMES ORODISPERSÍVEIS DE AMIDO E GELATINA. *Iniciação Científica Cesumar*, 21(1), 15. <https://doi.org/10.17765/1518-1243.2019v21n1p15-25>
- Reyes, L. (2017). Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) ou hortelã (*Mentha piperita*). Universidade de Sao Paulo.c
- Reyes Méndez, LM, Méndez Morales, PA, López-Córdoba, A., Ortega-Toro, R., & Gutiérrez, TJ (2023). Películas y recubrimientos activos a base de quitosano/gelatina que contienen eugenol y aceite esencial de orégano para la conservación de queso fresco. *Journal of Food Process Engineering* , 46 (11), e14396. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14396>
- Reyes, L.M., Landgraf, M. P.J.A. Sobral, Gelatin-based films activated with red propolis ethanolic extract and essential oils, *Food Packaging and Shelf Life*, Volume 27, 2021,

100607, ISSN 2214-2894, <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100607>

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214289420306256>)

Rios Gomez, Yolanda. (2015). *Química y Farmacología de Iridoides*. Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenida Universidad 1001, Chamilpa, 62209, Cuernavaca, Morelos, México yolanda@uaem.

(15) (PDF) *Química y Farmacología de Iridoides*. Available from:

https://www.researchgate.net/publication/305437256_Quimica_y_Farmacologia_de_Iridoides [accessed Jun 11 2024].

Rivera-Mondragón Andrés, Tuentner Emmy, Ortiz Orlando, Sakavitsi Maria E., Nikou Theodora, Halabalaki Maria, Caballero-George Catherina, Apers Sandra, Pieters Luc, Foubert Kenn, UPLC-MS/MS-based molecular networking and NMR structural determination for the untargeted phytochemical characterization of the fruit of *Crescentia cujete*

(Bignoniaceae), *Phytochemistry*, Volume 177, 2020, 112438, ISSN 0031-9422,

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2020.112438>.

(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942220300601>)

Roohinejad, S., Nikmaram, N., Brahim, M., Koubaa, M., Khelfa, A., & Greiner, R. (2017).

Potential of novel technologies for aqueous extraction of plant bioactives. In *Water extraction of bioactive compounds* (pp. 399-419). Elsevier.

Roth, L.M.; Eisner, T. Chemical defenses of arthropods. *Ann. Rev. Entomol.* 1962, 7, 107-136.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-108380-9.X5001-7>

Roversi, D., Luca, V., Aureli, S., Park, Y., Mangoni, M. L., & Stella, L. (2014). How many

antimicrobial peptide molecules kill a bacterium? The case of PMAP-23. *ACS chemical biology*, 9(9), 2003–2007. <https://doi.org/10.1021/cb500426r>

- Seetharaman, P. K., Kuberan, R., Prabukumar, S., Rajkuberan, C., Ravindran, K., & Sivaramakrishnan, S. (2015). Isolation and characterization of endophytic fungi from medicinal plant *Crescentia cujete* L. and their antibacterial, antioxidant and anticancer properties isolation and characterization of endophytic fungi from medicinal plant *crescentia cujete* L. And their antibacterial, antioxidant and anticancer properties Original Article. In Article in International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. <https://www.researchgate.net/publication/283341297>
- Schymanski L., Emma, Junho Jeon, Rebekka Gulde, Kathrin Fenner, Matthias Ruff, Heinz P. Singer y Juliane Hollender *Ciencia y tecnología ambientales* 2014 48 (4), 2097-2098
DOI: 10.1021/es5002105
- Shahidi, F. y Naczk, M. (1995) *Fenólicos alimentarios: fuentes, química, efectos y aplicaciones*. Technomic Publishing Co., Lancaster.
- Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J., Naseem, S., 2016. Gold nanoparticles: an efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. P. Seetharaman et al. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 11 (2017) 75–82 *Nanomaterials* 6 (4), 71
- Simonnot, M., y otros seis autores. (1997). Experimental Study and Modeling of Gelatin Production from Bone Powder: Elaboration of and Overall Kinetic Scheme for the Acid Process. *ChemEng J.*: 67(1), 55-64.
- Singleton, V., & Rossi Jr, J. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144–158.

Swami, S., Singh, K. S. P., Longo, G., & Dutt, D. (2008). Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Trieste: United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology, 200-66

Tecnilab, 20 junio de 2024. Funcionalidades y ventajas del extractor soxhlet automático.

<https://www.tecnilab.es/soxhlet-automatico/>.

Tescarollo, I. L., Oliveira, A. C., Fiorin, A. P. C., & Nascimento, M. F. (2019). Caracterización de películas bucodispersables formuladas con aromas naturales. Revista Científica Multidisciplinar Núcleo Do Conhecimento.

<https://doi.org/10.32749/nucleodoconhecimento.com.br/salud/peliculas-bucodispersables>

Trease GE, Evans WE (1989). Pharmacognosy. 11th Edn. Brailier tiridel and Macmillan Publisher.

Valachovic P. Towards the industrial production of medicinal tincture by ultrasound assisted extraction. Ultrason Sonochem. 2001;8(2):111-7.

Valencia Ortiz, C. (1995). Fundamentos de Fitoquímica. Méjico: Trillas 235 pp.

VERMERRIS W. AND NICHOLSON, R. Phenolic compound biochemistry, Springer Science+Business Media B.V., Berlin. 2008.

Wang, W., Tang, K., Yang, H. R., Wen, P. F., Zhang, P., Wang, H. L., & Huang, W. D. (2010). Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. Plant physiology and biochemistry: PPB, 48(2-3), 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.12.002>

Yi, K., Cheng, G., & Xing. (2015). Gelatin/Tannin Complex Nanospheres via Molecular Assembly. Tianji