



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PROYECTO DE TESIS

ELABORACIÓN DE UNA PELÍCULA ORAL REFRESCANTE A BASE
DE GELATINA CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias de los Alimentos

PRESENTA
IBT. Jenni Itzel Rosales Celso

Director
Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Codirectora
Dra. Arely León López

Asesores
Dr. Rafael Germán Campos Montiel
Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Tulancingo de Bravo, Hgo., México. Septiembre 2023



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Elaboración de una película oral refrescante a base de gelatina con propiedades antioxidantes", que desarrolla la estudiante Jenni Itzel Rosales Celso

Asistentes:

- Dr. Gabriel Aguirre Álvarez
- Dra. Arely León López
- Dr. Rafael Germán Campos Montiel
- Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Jenni Itzel Rosales Celso, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 20 de septiembre de 2023

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Dra. Arely León López

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes



Handwritten signatures of the committee members over horizontal lines.



Avenida Universidad Km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa,
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono +52 (771) 71 72000 ext. 2425
maestria_alimentos@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios de posgrado.

A mi director de tesis el Dr. Gabriel Aguirre Álvarez, a mi codirectora la Dra. Arely León López y mis asesores el Dr. Rafael Germán Campos Montiel y la Dra. Alma Delia Hernández Fuentes, por haberme dirigido, siempre estar dispuestos a aclarar mis dudas y por el apoyo en la realización de esta investigación.

A mis compañeras del laboratorio con quienes compartí jornadas largas de estudio y siempre me ayudaron con consejos profesionales y de vida.

A mi familia y amigos por alentarme a perseguir mis sueños, en especial a mi madre por siempre estar.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
2. Antecedentes.....	5
2 MARCO TEÓRICO	7
2.1 Películas orales.....	7
2.2 Polímeros utilizados en películas orales	9
2.2.1 Proteínas	10
2.2.2 Gelatina	10
2.2.3 Formación de películas orales por el método de casting.....	12
2.3 Propiedades fisicoquímicas en películas orales.....	13
2.3.1 Espesor	13
2.3.2 Color	13
2.3.3 pH.....	13
2.3.4 Disolución de la película oral	13
2.4 Incorporación de ingredientes bioactivos en películas orales	13
2.5 Granada (<i>Punica granatum</i>).....	14
2.5.1 Producción de granada a nivel mundial.....	15
2.5.2 Usos de la granada.....	15
2.5.3 Composición morfológica	16
2.5.4 Composición química	17
3 Justificación.....	19

4	Objetivos	20
4.1	Objetivo general	20
4.1.1	Objetivos específicos	20
5	Hipótesis	21
6	MATERIALES Y MÉTODOS	22
6.1	Materiales	22
6.2	Obtención del jugo de granada	22
6.3	Caracterización del jugo de granada.....	22
6.3.1	Análisis químico proximal jugo de granada	22
6.3.2	Actividad antioxidante del jugo de granada	25
6.4	Elaboración de las películas orales refrescantes	28
6.5	Propiedades fisicoquímicas de las películas orales refrescantes	28
6.5.1	Análisis proximal de películas orales	28
6.5.2	Espesor	29
6.5.3	pH de la película	29
6.5.4	Color	29
6.5.5	Tiempo de disolución de las películas orales refrescantes.....	29
6.5.6	Propiedades térmicas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) ...	29
6.5.7	Análisis de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	30
6.6	Determinación de actividad antioxidante.....	30
6.6.1	Extracción de compuestos bioactivos de las películas orales	30
6.7	Análisis estadístico.....	30
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
7.1	Caracterización del jugo de granada.....	31

7.1.1	Caracterización químico proximal del jugo de granada	31
	Tabla 5. Caracterización del jugo de granada.....	32
7.1.2	Actividad antioxidante del jugo de granada	32
7.2	Propiedades fisicoquímicas de las películas orales refrescantes	34
7.2.1	Análisis proximal en películas orales.....	34
7.2.2	Espesor	36
7.2.3	pH de la película oral.....	36
7.2.4	Color	37
7.2.5	Tiempo de desintegración	38
7.2.6	Propiedades térmicas por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)	39
7.2.7	Análisis por FTIR.....	41
7.2.8	Actividad antioxidante en películas orales.....	44
8	CONCLUSIONES	49
9	Anexos	50
10	BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales ingredientes en la elaboración de películas orales.	8
Tabla 2. Polímeros más utilizados en la elaboración de películas orales (Bala et al., 2013; Dahiya et al., 2009; Sevinç Özakar & Özakar, 2021)	10
Tabla 3. Componentes químicos y su bioactividad de diferentes partes del árbol de granada (Prasad & Kunnaiah, 2014).	17
Tabla 4. Formulaciones de las películas orales.	28
Tabla 5. Caracterización del jugo de granada.	32
Tabla 6. Evaluación de actividad antioxidante del jugo de granada (<i>P. granatum</i>) obtenido por método de prensado manual.	33
Tabla 7. Análisis proximal en películas orales.	34
Tabla 8. Caracterización fisicoquímica de las películas orales.	36
Tabla 9. Determinación de color en películas orales.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura básica de la gelatina. Tomado de Kommareddy et al. (2007)..	11
Figura 2. Capacidad de los compuestos antioxidantes para neutralizar radicales libres mediante la donación de electrones y proteger biomoléculas del daño oxidativo. Tomado de (Abril-Ibarra, 2021).	14
Figura 3. Producción de granada en el año 2020 (SIAP, 2020).	15
Figura 4. Composición del fruto de granada, tomado de (Alkhatib et al., 2022).	16
Figura 5. Tiempo de desintegración en películas orales.	39
Figura 6. Propiedades térmicas por calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en películas orales.	41
Figura 7. Análisis FTIR en películas orales.	43
Figura 8. Actividad antioxidante por porcentaje de inhibición del radical ABTS en las películas orales.	44
Figura 9. Actividad antioxidante por porcentaje de inhibición del radical DPPH en las películas orales.	45
Figura 10. Contenido total de fenoles en películas orales.	46

Figura 11. Contenido de flavonoides presentes en películas orales.....	47
Figura 12. Contenido de antocianinas en películas orales	48

RESUMEN

En la placa dental se pueden encontrar microorganismos responsables de ocasionar caries o mal aliento, para prevenir estos problemas surgen productos como películas orales refrescantes, a las cuales se les adicionan componentes como medicamentos, vitaminas y actualmente agentes antioxidantes. Los agentes antioxidantes pueden neutralizar o inhibir la propagación de radicales libres que conducen a la degeneración celular. Por lo tanto, se elaboró una película oral refrescante a base de gelatina (2 %), maltodextrina (1 %) y tween 80 (0.5 %); con actividad bioactiva mediante la incorporación de extracto de jugo de granada a diferentes concentraciones (3, 4 y 5 ml) y aceite esencial de menta (2 %).

Se evaluaron sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. Encontrando espesores de 0.037 ± 0.005 mm a 0.047 ± 0.001 mm, valores de pH en las películas orales de 6.830 ± 0.260 a 3.557 ± 0.384 , lo que sugiere películas delgadas con un pH ácido. En cuanto a color, se presentaron valores para L^* 87.518 ± 1.034 a 74.858 ± 1.424 y para el croma a^* de 0.402 ± 0.183 a 14.612 ± 1.002 y para el croma b^* 5.408 ± 0.244 a 1.250 ± 0.201 , indicando películas luminosas con colores rojizos y con tendencia a colores amarillos. El tiempo de disolución en las películas se encontró entre 28.333 ± 3.512 s a 52.333 ± 3.055 s, ocasionados por la naturaleza hidrofílica de las películas orales. Las propiedades térmicas indicaron una baja estabilidad en la matriz polimérica, ocasionado a compuestos hidrofílicos. El análisis de FTIR reveló que no existió la presencia de nuevos picos en las formulaciones de las películas, revelando grupos funcionales de los componentes ocupados para las formulaciones. Los ensayos de ABTS y DPPH indicaron actividad antioxidante en las películas orales, además se encontró la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y antocianinas. Las películas orales presentaron un tiempo de disolución corto y actividad antioxidante, encontrando que el jugo de granada influyó en las características de las mismas.

Palabras clave: *películas orales, biopolímeros, granada, actividad antioxidante.*

ABSTRACT

Microorganisms responsible for causing cavities or bad breath can be found in dental plaque. To prevent these problems, products such as refreshing oral films emerge, to which components such as medications, vitamins and currently antioxidant agents are added. Antioxidant agents can neutralize or inhibit the spread of free radicals that lead to cellular degeneration. Therefore, a refreshing oral film was made based on gelatin (2%), maltodextrin (1%) and tween 80 (0.5%); with bioactive activity by incorporating pomegranate juice extract at different concentrations (3, 4 and 5 ml) and mint essential oil (2%).

Their physicochemical and functional properties were evaluated. Finding thicknesses of 0.037 ± 0.005 mm to 0.047 ± 0.001 mm, pH values in the oral films of 6.830 ± 0.260 to 3.557 ± 0.384 , suggesting thin films with an acidic pH. Regarding color, values were presented for L^* 87.518 ± 1.034 to 74.858 ± 1.424 and for chroma a^* from 0.402 ± 0.183 to 14.612 ± 1.002 and for chroma b^* 5.408 ± 0.244 to 1.250 ± 0.201 , indicating luminous films with reddish colors and with a tendency to yellow colors. The dissolution time in the films was found between $28,333 \pm 3,512$ s to $52,333 \pm 3,055$ s, caused by the hydrophilic nature of the oral films. The thermal properties indicated a low stability in the polymer matrix, caused by hydrophilic compounds. The FTIR analysis revealed that there was no presence of new peaks in the film formulations, revealing functional groups of the components occupied for the formulations. The ABTS and DPPH assays indicated antioxidant activity in the oral films, and the presence of phenolic compounds, flavonoids and anthocyanins was also found. The oral films presented a short dissolution time and antioxidant activity, finding that pomegranate juice influenced their characteristics.

Keywords: *oral films, biopolymers, pomegranate, antioxidant activity.*

1 INTRODUCCIÓN

Enfermedades orales, como caries dental o mal aliento, están asociadas a la presencia de microorganismos en la placa; para prevenir ello, es ideal seguir medidas preventivas como el cepillado de dientes, el uso de hilo dental y enjuague bucal (Fernández Valdés et al., 2015; Nasseripour et al., 2022)

En la actualidad han surgido diversos productos para tratar problemas leves de mal aliento que presenta la mayoría de la población, como gomas de mascar, aerosoles y películas orales refrescantes (Xu et al., 2002).

A principios del año 2002, surgen las películas orales refrescantes, que son aquellas que contienen un agente refrescante que, al entrar en contacto con la saliva, este se libera dejando un aliento agradable y fresco. Estas películas se convirtieron en una alternativa a las gomas de mascar ya que debido al alto contenido de azúcar pueden llegar a ocasionar caries, además de ser un problema ambiental, ya que están elaboradas de material no degradable (Himani et al., 2022).

Una película oral refrescante, es una capa delgada y flexible, tiene un espesor de 5-50 μm , su principal característica es que se desintegra y disuelve rápidamente al entrar en contacto con la saliva (20-30 segundos), debido a que se encuentran elaboradas con polímeros de naturaleza hidrofílica, entre los que destacan pululano, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa, maltodextrina, gelatina, entre otros (Dixit & Puthli, 2009).

La gelatina es un importante polímero formador de películas orales, la cual es una proteína natural, derivada de la hidrólisis parcial de colágeno, el cual puede ser obtenido de huesos, tendones y pieles de animales como bovinos, porcinos, ovinos, aves, peces, insectos (Calixto et al., 2018). Esta proteína es ocupada en la elaboración de películas, debido a su biodegradabilidad, no toxicidad, su solubilidad en agua, así como su biocompatibilidad (Shaikh et al., 2021). La gelatina por si sola presenta buenas propiedades de formación de películas, sin embargo, se pueden incorporar a ellas otros ingredientes que le permitan proporcionar propiedades funcionales, como lo es agentes refrescantes (Jovanović et al., 2021).

Existen diversos agentes refrescantes ocupados en el cuidado bucal, dentro de los cuales, se encuentran extractos de menta, hierbabuena, canela, etc (Karki et al., 2016).

A pesar de que las películas orales, se elaboraron en un principio con agentes refrescantes, en la actualidad han surgido diversas investigaciones sobre películas orales a las cuales se les ha adicionado diversos ingredientes activos, entre ellos destacan medicamentos, vitaminas, así como compuestos antimicrobianos y antioxidantes, que pueden ser obtenidos de diversas fuentes de plantas y frutas como la granada (Himani et al., 2022).

La granada (*Punica grannatum L.*) presenta una buena calidad nutrimental, debido a sus aportes de vitaminas, minerales y compuestos bioactivos. De estos últimos, predominan polifenoles, como antocianinas, flavonoles y taninos, los cuales son los principales responsables de brindar actividad antioxidante (Uzuner, 2020).

Es por ello que en este trabajo se elaboró una película oral refrescante a base de gelatina con propiedades antioxidantes, esto con ayuda de jugo de granada y así determinar sus propiedades fisicoquímicas y funcionales.

2. Antecedentes

Las películas orales se introdujeron en el mercado como refrescantes de aliento mediante una compañía farmacéutica (Pfizer) y las nombraron como Listerine® pocket packs™. Estas películas están elaboradas a base de pululano, como polímero formador, su característica principal es que se disuelven instantáneamente al entrar en contacto con la saliva y matan el 99% de microorganismos que causan el mal aliento, derivado de una mezcla de aceites esenciales con actividad antimicrobiana, entre ellos mentol (Xu et al., 2002).

A partir de este producto surgieron diversos tipos de películas orales que incorporaban ingredientes activos, como vitaminas, medicamentos y extractos de hierbas (Dixit & Puthli, 2009).

Abruzzo et al. (2012) diseñaron películas orales a base de gelatina y quitosano para administrar clorhidrato de propranolol, encontrando una buena relación entre ambos, además, de obtener un menor tiempo de disolución (10 min) al aumentar la concentración de gelatina. Estas películas resultaron adecuadas para su compatibilidad con la microflora bucal.

Zhang et al. (2019) elaboraron una película oral automicroemulsionante de disolución rápida para pacientes lactantes, la cual estaba elaborada con metilcelulosa como polímero formador de película y vitamina D3 como ingrediente activo, la cual presentó buenas propiedades mecánicas y su tiempo de disolución fue de 18 ± 1.23 segundos.

Ahmed et al. (2020) desarrollaron una película oral como base para posteriormente adicionar fármacos, esta película se encontraba elaborada a base de gelatina y carboximetilcelulosa sódica a diferentes concentraciones, obteniendo una película, en color blanco, sin embargo, sus propiedades mecánicas fueron pobres debido al plastificante ocupado (glicerol) y su tiempo de disolución fue de 16 segundos.

Jovanović et al. (2021) crearon una película oral a base de gelatina de piel porcina y otra con gelatina de piel bovina, a ambas se le agregó clorhidrato de propranolol. Encontrando una buena relación entre la gelatina de piel porcina y el medicamento, además de presentar un mayor modulo elástico, resistencia a la tracción y dureza.

Himani et al. (2021) formularon películas orales a base de maltodextrina, quitosano y pululan, en diferentes concentraciones, además, adicionaron extracto de clavo como agente antioxidante y su tiempo de disolución de las películas fue de 51 segundos.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Películas orales

Las películas orales son una capa de polímeros delgada y flexible, tienen un espesor de 5-150 μm y un área de 1-20 cm^2 , al entrar en contacto con la saliva se disuelven rápidamente en alrededor de 20-60 segundos (Bala et al., 2013). Debido a su rápida disolución, son ideales para administrar ingredientes farmacéuticos a pacientes pediátricos y geriátricos, además de aquellos que presentan problemas para ingerir tabletas, capsulas o jarabes (Karki et al., 2016).

Surgieron como una forma de dosificación rápida de agentes refrescantes, a principios del año 2002 fue lanzada al mercado la primera película oral como un refrescante bucal para atender a pacientes con problemas de mal aliento y siendo una alternativa a gomas de mascar, las cuales suelen presentar poca aceptación para algunas personas (Himani et al., 2022). En consecuencia, en el año 2003 se ofertó la primera película oral que contenía benzocaína como tratamiento al dolor de garganta y tiempo después surgieron otras películas orales que contenían fármacos para tratar náuseas o vómitos, entre otros (Tian et al., 2023).

En países asiáticos se han incorporado productos farmacéuticos naturales en películas orales, debido a que poseen actividad antiinflamatoria, anticancerígena, anestésica, antibacteriana y antioxidante (Visser et al., 2017).

Para la formulación de las películas orales se involucran materiales como polímeros, plastificantes, ingredientes activos, edulcorantes, estimulantes de saliva, saborizantes, colorantes, estabilizadores (Tabla 1) (Jain et al., 2018).

Tabla 1. Principales ingredientes en la elaboración de películas orales.

Ingrediente	Función	Ejemplos	Referencia
Polímeros solubles en agua	Solubles en agua, pueden ser ocupados solos o en combinación, de acuerdo a las propiedades deseadas.	Hidroxipropil metilcelulosa, pululan, pectina, gelatina.	(Kalyan & Bansal, 2012)
Plastificantes	Aumentar la flexibilidad y disminuir la transición vítrea del polímero, reduciendo la friabilidad de la película y aumentan la resistencia a la tracción.	Sorbitol, polietileno glicol, manitol, glicerol.	(Saini et al., 2012)
Agentes endulzantes	Aumentan el sabor de las películas orales.	Sacarina, ciclamato, aspartamo, manitol, glucosa, galactosa, manosa.	(Himani et al., 2022)
Estimulantes de saliva	Incrementan la secreción de la saliva para que se disuelvan y desintegren fácilmente.	Ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido ascórbico.	(Dixit & Puthli, 2009)
Colorantes	Mejoran la apariencia de la película.	Colorantes aprobados por la Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos.	(Siddiqui et al., 2010)
Ingredientes activos	Deben dejar una buena sensación en la boca, ser solubles al estar en contacto con la saliva y tener una buena relación con los polímeros.	Agentes refrescantes de aliento, medicamentos, vitaminas, agentes antimicrobianos y antioxidantes.	(Sevinç Özakar & Özakar, 2021)

Se han introducido diversos ingredientes activos en las películas orales, que van desde agentes refrescantes (mentol) hasta medicamentos (anticancerígenos, antiepilépticos,

cardiovasculares, analgésicos, anti alérgicos, sedativos, entre otros), estos ingredientes, son ocupados en bajas dosis, deben dejar una buena sensación en la boca, ser solubles al estar en contacto con la saliva y tener una buena relación con los polímeros ocupados para realizar las películas (Sevinç Özakar & Özakar, 2021).

2.2 Polímeros utilizados en películas orales

La selección de los polímeros en la elaboración de películas, se debe a los parámetros necesarios para lograr las propiedades deseadas de dichas películas (Ghodake et al., 2013). Un polímero ideal para la elaboración de películas orales debe cumplir con las siguientes características:

- No debe ser tóxico e irritante.
- No debe contener impurezas.
- Debe tener suficientes propiedades humectantes.
- Debe presentar suficiente tensión y resistencia a la tracción.
- Debe ser accesible y de bajo costo.
- No debe causar infecciones secundarias en las áreas dentales o mucosa oral.
- Debe tener una buena sensación en la cavidad bucal.
- No debe ser un impedimento para el tiempo de desintegración (Dixit & Puthli, 2009; Nagar et al., 2011).

Se pueden elaborar películas orales a base de uno o una combinación de polímeros, con el objetivo de reforzar las propiedades de estos (Sharma et al., 2015). En la tabla 2 se presentan los polímeros más utilizados en la elaboración de películas orales, así como algunas de sus cualidades (Sevinç Özakar & Özakar, 2021). Por ejemplo, el pululan se usa para preparar películas delgadas con alta resistencia mecánica y disolución, estable en una amplia gama de temperatura; en cambio, la gelatina presenta películas brillantes y atractivas (Karki et al., 2016; Siddiqui et al., 2010).

Tabla 2. Polímeros más utilizados en la elaboración de películas orales (Bala et al., 2013; Dahiya et al., 2009; Sevinç Özakar & Özakar, 2021)

Clase	Nombre	Solubilidad en agua	pH	Humedad (%)
Carbohidratos	Pululano	Agua fría y caliente (4 -90°C)	5-7	6
	Pectina	Agua caliente (85-90°C)	6- 7.2	10
	Maltodextrina	Agua fría y caliente (4 - 90°C)	4-7	6
Proteína	Gelatina	Agua caliente (35-90°C)	3.8- 6	10

2.2.1 Proteínas

Los materiales que se encuentran a base de proteínas consisten en redes macromoleculares, ordenadas y de baja humedad. Las películas de proteínas tienen la característica de adherirse fácilmente a superficies hidrófilas, sin embargo, su desventaja es su sensibilidad a los cambios de pH, por lo cual es necesario determinar las condiciones óptimas de formación. Entre las proteínas más utilizadas en la elaboración de películas orales de rápida disolución, se encuentra la gelatina (Zhang et al., 2018).

2.2.2 Gelatina

La gelatina puede obtenerse a partir de la desnaturalización térmica del colágeno, el cual puede ser extraído de piel, huesos, tendones y tejidos de animales, como bovinos, cerdos, pollos, peces, insectos, etc. La gelatina tiene un peso molecular que oscila entre 20-250 kDa, consta de 19 aminoácidos, de los cuales predominan glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 1) (Calixto et al., 2018; Shaikh et al., 2021).

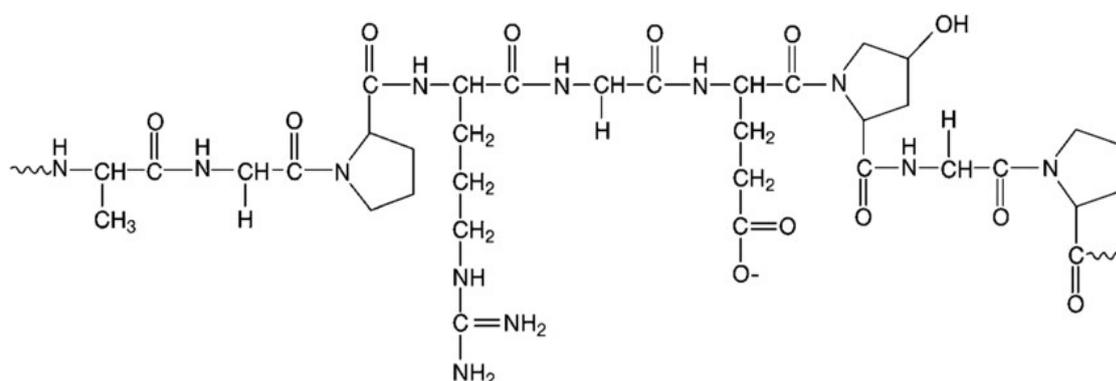


Figura 1. Estructura básica de la gelatina. Tomado de Kommareddy et al. (2007).

La gelatina forma soluciones coloidales con el agua, por lo que ha sido utilizada en la industria alimentaria, debido a su valor nutricional y por su multifuncionalidad. Las propiedades nutricionales y fisiológicas de la gelatina están relacionadas a la secuencia de aminoácidos, su conformación espacial, distribución de la masa molecular, pH, fuerza iónica y su reacción con otros componentes (Schrieber & Gareis, 2007).

La gelatina es una sustancia incolora o ligeramente amarilla, disponible en gránulos, láminas, escamas o polvos sólidos, transparentes, quebradizos, inodoros e insípidos, solubles en agua caliente, glicerol y ácido acético e insoluble en disolventes orgánicos. La gelatina se hincha y absorbe de 5 a 10 veces su peso en agua para formar un gel. Se usa ampliamente como ingrediente alimentario y como agente gelificante que forma geles termorreversibles elásticos transparentes al enfriarse por debajo de 35°C (Calixto et al., 2018).

Las aplicaciones de la gelatina dependerán de la fuente del colágeno de donde se obtiene y su método de extracción (ácido o alcalino) (Aguirre-Álvarez et al., 2012).

Dentro del proceso para la obtención de gelatina destacan tres pasos importantes:

1. Consiste en el lavado de la fuente de colágeno y el pretratamiento con álcali, ácido o enzimas (por ejemplo, pepsinas).
2. Calentamiento a través de agua (temperaturas arriba de 45°C) que comprende la extracción real de gelatina.

3. La filtración y secado de la gelatina, triturando en un polvo sólido (Al-Nimry et al., 2021).

Con ayuda de un pretratamiento químico se romperán los enlaces no covalentes, lo que desorganizará la estructura de la proteína, ocasionando una hinchazón y solubilización del colágeno. El tratamiento térmico permite romper los enlaces de hidrogeno y covalentes, lo que desestabiliza la triple hélice, dando como resultado una transición de hélice a espiral y así convirtiendo el colágeno en gelatina soluble. De acuerdo al pretratamiento ácido o alcalino, se pueden obtener dos tipos de gelatina, la gelatina tipo A (con un punto isoeléctrico a pH ~ 8-9) y la gelatina tipo B (con un punto isoeléctrico a pH ~ 4-5) (Gómez-Guillén et al., 2011).

Las propiedades funcionales de la gelatina se pueden dividir en dos, el primero, de acuerdo a su poder de gelificación, que está asociado a la fuerza del gel, temperatura de fusión y viscosidad y el segundo, relacionado al comportamiento superficial de la gelatina, como la formación y estabilidad de espumas y emulsiones, sus propiedades adhesivas y su comportamiento de disolución (Schrieber & Gareis, 2007).

En la actualidad la gelatina ha sido muy estudiada por su capacidad para formar películas orales de disolución rápida, debido a que presenta buena elasticidad, estabilidad, además de un bajo costo, biocompatibilidad y biodegradación (Shaikh et al., 2021). Existen diversos métodos para elaborar películas a base de gelatina, entre ellos destacan extrusión de fusión en caliente, fundición semisólida, extrusión de dispersión sólida y el más utilizado que es el *casting* o método de fundición con solvente (Khairnar et al., 2009).

2.2.3 Formación de películas orales por el método de casting

Este método es el más utilizado para elaborar películas orales, debido a que es factible, su proceso de fabricación es sencillo y de bajo costo. En este método se deben tomar en cuenta las propiedades reológicas de la mezcla de biopolímeros ya que pueden afectar la velocidad de secado, el espesor de la película, su morfología y uniformidad. En el *casting*, la mezcla biopolimérica puede presentar burbujas de aire, es por ello que la desaireación es un requisito previo para obtener un producto homogéneo. La

etapa final del *casting*, que es el secado, permite que el solvente se evapore, dejando una película oral lista (Borges et al., 2015; Ghodake et al., 2013; Karki et al., 2016).

2.3 Propiedades fisicoquímicas en películas orales

2.3.1 Espesor

El espesor de una película oral define la uniformidad de la misma, este oscila entre 5-50 μm , son películas ultrafinas (Bhyan et al., 2011).

2.3.2 Color

El color de las películas está influenciado por el tipo y concentración del material agregado. Esta característica deber ser atractiva para los consumidores. La transparencia y opacidad del biopolímero se debe a la morfología o estructura química relacionada a su peso molecular (Fai et al., 2016).

2.3.3 pH

El pH de la película es importante, pues puede ocasionar efectos secundarios en la mucosa oral. Un pH demasiado ácido o básico puede favorecer a disminuir el tiempo de desintegración de las películas orales (Bala et al., 2013; Nair et al., 2013).

2.3.4 Disolución de la película oral

El tiempo de disolución puede variar dependiendo de la formulación de la película, típicamente el rango va desde 20 a 60 segundos (Prajapati et al., 2018).

2.4 Incorporación de ingredientes bioactivos en películas orales

En la actualidad, se han incorporado agentes con actividad antioxidante, como flavonoides y compuestos fenólicos a las películas orales (Briassoulis & Giannoulis, 2018). A los compuestos fenólicos se les han atribuido propiedades antioxidantes, debido a su capacidad para inhibir la formación y propagación de radicales libres que pueden causar reacciones de oxidación. La figura 2 muestra la capacidad de los compuestos fenólicos para estabilizar radicales libres vía donación de hidrógeno o de

electrón; su actividad antioxidante está dada por el número y localización de sus grupos hidroxilos en el anillo aromático (Abril-Ibarra, 2021).

Existen un gran número de compuestos fenólicos que pueden obtenerse de extractos de plantas o frutas como los presentes en la granada.

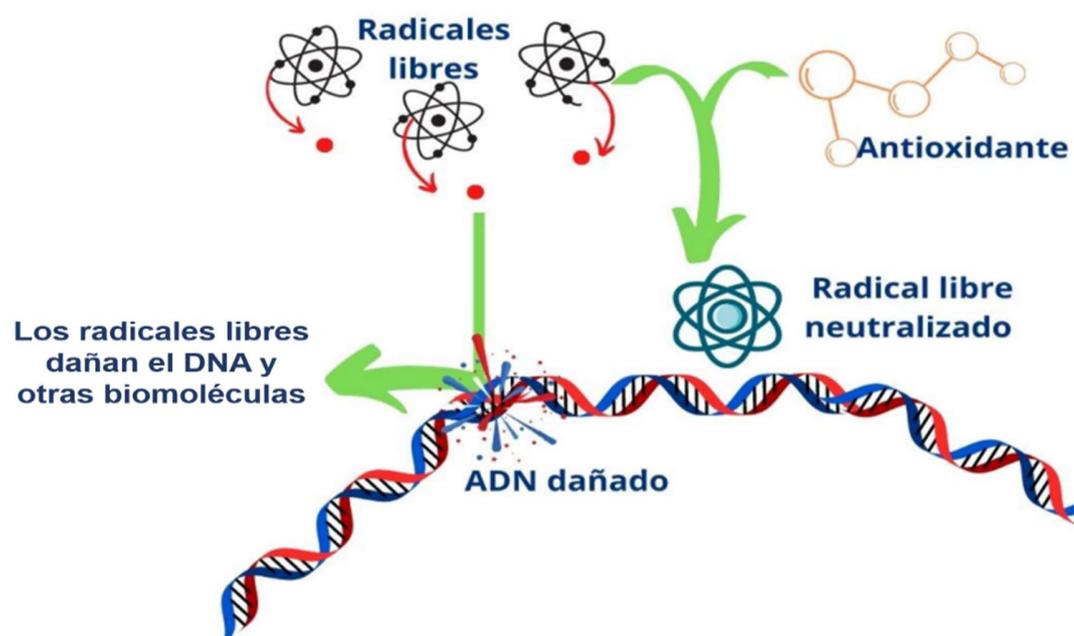


Figura 2. Capacidad de los compuestos antioxidantes para neutralizar radicales libres mediante la donación de electrones y proteger biomoléculas del daño oxidativo. Tomado de (Abril-Ibarra, 2021).

2.5 Granada (*Punica granatum*)

P. granatum (granada) es una planta y fruta antigua, su nombre proviene del latín *Malum granatum*, que significa “manzana granulada”; este fruto se obtiene de un árbol perteneciente a la familia *Punicaceae*. Es originaria del norte de la India e Irán, el fruto fue traído a América por españoles durante la conquista y logro adaptarse en algunas zonas cálidas y áridas de Estados Unidos y México (Holland et al., 2009; Prasad & Kunnaiah, 2014; Ward & Cheryl, 2003).

2.5.1 Producción de granada a nivel mundial

Hasta el día de hoy los principales productores y exportadores de granada son India, Irán, China, Turquía y Estados Unidos, seguidos de Chile, Perú y México (Alberto Coronado-Reyes et al., 2020). En México la producción de granada, para el año 2020 fue de 8,769.36 ton, siendo Morelos el estado con mayor producción, seguido de Hidalgo y Oaxaca. En Hidalgo, su producción en el año 2020 fue de 1,501.36 ton, de la cual Tasquillo ocupa el primer lugar en donde se produjeron 556.80 ton, como se puede observar en la figura 3 (SIAP, 2020). La época en la cual se recolecta la granada en México es en los meses de junio-septiembre (Coronado-Reyes Jesús Alberto, 2021).

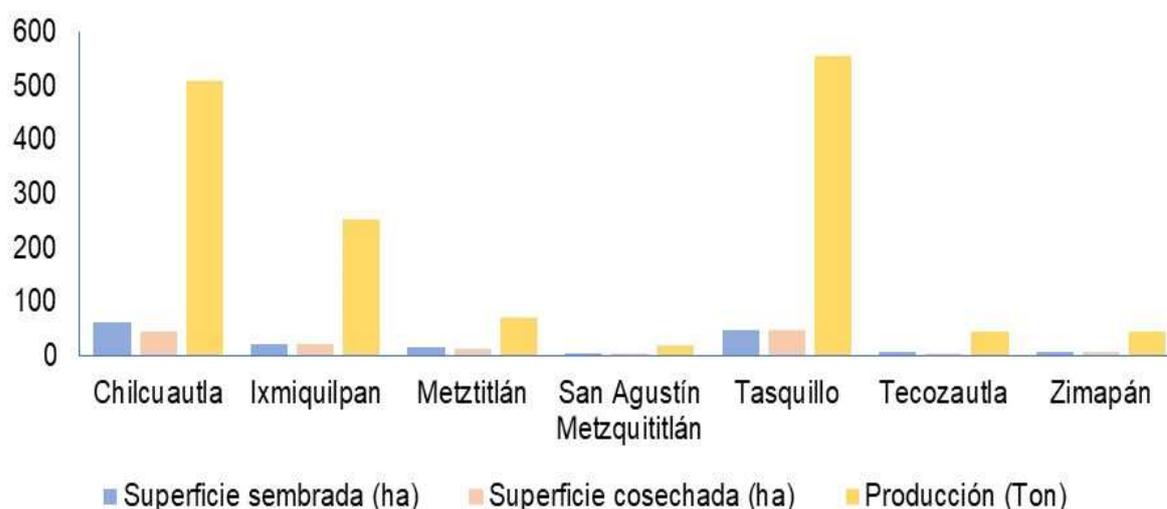


Figura 3. Producción de granada en el año 2020 (SIAP, 2020).

2.5.2 Usos de la granada

El cultivo de granada (*P. granatum*) es considerado uno de los más importantes comercialmente para su consumo en fresco y para su procesamiento industrial de alimentos. Actualmente se ocupan los extractos de granada de cascaras, semillas y hojas como tratamiento de la reducción de la tumorigénesis mamaria, enfermedades del corazón, quimioprevención del cáncer y quimioterapia, así como en disentería, diarrea y patologías respiratorias, todo ello gracias a sus componentes bioactivos y nutrientes beneficiosos (Ferrazzano et al., 2017; Longtin, 2003).

La granada, en la actualidad, se consume como fruta fresca, jugos frescos y fermentados, mermeladas y como agente saborizante y colorante en alimentos y bebidas (Fawole et al., 2012). Los cultivos de granada se pueden clasificar de acuerdo a su sabor (dulce, agridulce y agrío), al tiempo de cosecha (temprana, media y tardía) y de acuerdo a su consumo (jugo o fruta de mesa) (Uzuner, 2020).

2.5.3 Composición morfológica

La *P. granatum* (granada) es un arbusto grande que crece de 12 a 16 pies, su fruta madura mide aproximadamente 5 pulgadas de ancho con una piel coriácea de color rojo oscuro, contiene muchas semillas separadas por pericarpio membranoso blanco, cada semilla se encuentra rodeada de jugo agrío y rojo (Holland et al., 2009). El árbol/fruto se puede dividir en varios compartimentos anatómicos: semilla, jugo, cáscara, hoja, flor, corteza y raíces, aproximadamente el 50% del peso de la fruta consiste en partes no comestibles, es decir la membrana y la cáscara, mientras que la mitad restante consiste aproximadamente el 20% de las semillas y 80% de arilos, en la figura 4 se muestra la composición del fruto de granada (Uzuner, 2020). Los arilos contienen el 85% de agua, 10% de azúcares (fructosa y glucosa), 1.5% de pectina y ácidos orgánico; como ácido ascórbico, ácido cítrico y málico, compuestos bioactivos; como compuestos fenólicos y antocianinas (Jamróz & Kopel, 2020).

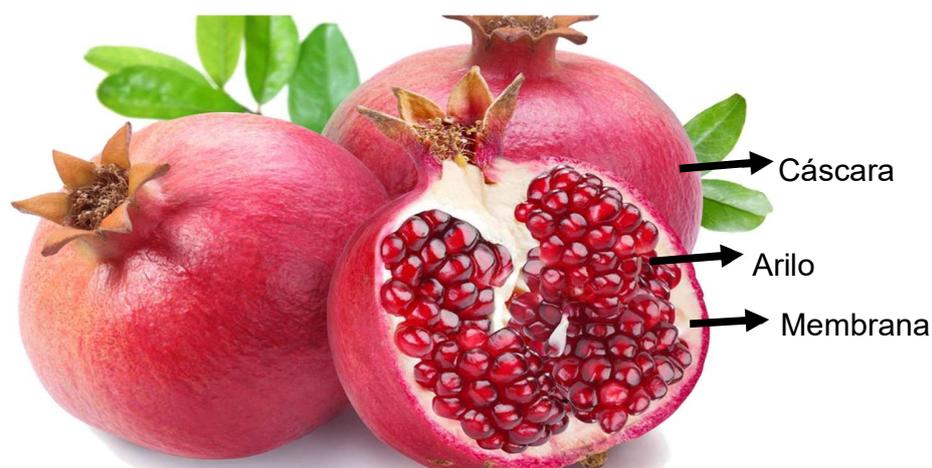


Figura 4. Composición del fruto de granada, tomado de (Alkhatib et al., 2022).

2.5.4 Composición química

La granada posee compuestos bioactivos a partir de extractos de corteza y membranas carpelares, entre ellos, polifenoles, flavonoides, elagitaninos, proantocianidinas, así como minerales, tal es el caso de calcio, fosforo, magnesio, potasio y sodio; al igual que azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa y maltosa; al igual que proteínas, fibra cruda, ácidos grasos, ácidos orgánicos, y alcaloides, como se muestra en la tabla 3 (Jamróz & Kopel, 2020; Pirzadeh et al., 2021).

Tabla 3. Componentes químicos y su bioactividad de diferentes partes del árbol de granada (Prasad & Kunnaiah, 2014).

Parte de la planta	Componente químico	Bioactividad
Jugo de granada	Antocianinas Glucosa Ácido ascórbico Ácido elágico Ácido gálico Ácido cafeico Catequina Epigallocatequina Quercetina Rutina Hierro Aminoácidos	Antiateroscleróticas Antihipertensivas Antienvjecimiento Antioxidantes
Aceite de semilla	Ácido punícico Esteroles	Nefroprotectoras
Pericarpio (cáscara y semilla)	Taninos (Punicalaginas) Flavonas Flavanoles	Antioxidante Antimicrobiana Antiinflamatoria Antimutagénica Antifúngica
Hojas de granada	Taninos (Punicalina y Punicafolina) Glucósidos de flavonas (luteolina y apigenina)	Antioxidantes
Flores	Ácido ursólico Triterpenoides (ácido maslínico y ácido asiático)	Antioxidantes Hepatoprotectoras

Raíces y corteza	Elagitaninos Alcaloides de piperidina	Antihelmínticas Vermifugas
------------------	--	-------------------------------

Existen diversos estudios en los cuales se ha demostrado la actividad antimicrobiana de las cáscaras, semillas y jugo de granada contra diversas bacterias transmitidas por alimentos, debido a sus compuestos fenólicos (Al-Zoreky, 2009). La composición fitoquímica de las diferentes partes de la granada pueden llegar a variar, esto depende de diversos factores geográficos y ambientales que pueden afectar el nivel de bioactividad de los metabolitos secundarios (O'Grady et al., 2014).

3 Justificación

Las gomas de mascar, son excelentes aliados para aminorar el mal aliento, sin embargo, presentan altos contenidos de azúcar, que podrían ocasionar problemas de caries. Además, son un foco de contaminación, pues la mayoría están elaboradas a base de polímeros sintéticos derivados del petróleo que pueden tardar a degradarse en aproximadamente 30 a 50 años. De acuerdo al INEGI, en el año 2019 se produjeron alrededor de 92,000 toneladas siendo un problema para el medio ambiente. Por lo tanto, han surgido alternativas a las gomas de mascar, como películas orales refrescantes.

La gelatina es uno de los polímeros naturales más utilizados en la elaboración de películas orales debido a su solubilidad en agua, además de ser una buena base polimérica para adicionar extractos naturales.

Es por ello que en esta investigación se elaboró una película a base de gelatina con jugo de granada, con el objetivo de aprovechar sus compuestos fenólicos, además de su sabor y color. Al mismo tiempo se adicionó aceite esencial de menta como agente refrescante.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Desarrollar una película oral refrescante a base de gelatina con actividad bioactiva mediante la incorporación de jugo de granada (*Punica granatum L.*) y aceite esencial de menta.

4.1.1 Objetivos específicos

- Obtener y caracterizar el jugo de granada, mediante un análisis químico proximal y determinar su actividad antioxidante, para su posterior uso en la elaboración de las películas orales.
- Diseñar la formulación ideal de las películas orales a base de gelatina con jugo de granada y aceite esencial de menta.
- Evaluar propiedades fisicoquímicas, tiempo de desintegración *in vitro* y actividad antioxidante de las películas orales.
- Evaluar propiedades térmicas de las películas por medio de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y realizar análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

5 Hipótesis

La adición de jugo de granada y aceite esencial de menta en la formulación de películas orales refrescantes a base de gelatina proporcionan propiedades bioactivas y aceleran el tiempo de desintegración de las mismas.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Se utilizó gelatina de piel de cerdo de 275° Bloom (Wilson Porcin Skin), maltodextrina (Mi granero, México), tween 80 (Meyer, México), aceite esencial de menta comestible (Naturaly, México) y granadas de la variedad Wonderful obtenidas del municipio de Tasquillo, Hidalgo para la obtención del jugo.

6.2 Obtención del jugo de granada

Las granadas fueron lavadas y sanitizadas, se cortaron por la mitad y se separaron las partes comestibles de la cáscara. El jugo de granada fue obtenido de forma manual, colocando los arilos en un extractor de jugos convencional, mediante la aplicación de presión. Una vez obtenido el jugo, se pasteurizó a 65°C por 30 min éste se en botellas ámbar, estas fueron almacenadas a $-8 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso (Khaksar et al., 2019).

6.3 Caracterización del jugo de granada

6.3.1 Análisis químico proximal jugo de granada

- **Determinación de humedad**

Se determinó el porcentaje de humedad gravimétricamente de acuerdo al método 925.45 (AOAC, 2005) colocando 5 g de jugo de granada en capsulas de aluminio (puestas previamente a peso constante) y secando en horno a una temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h, hasta mantener su peso constante. El porcentaje de humedad (%) se obtuvo por diferencia de peso antes del secado (peso inicial) y después del secado (peso final), de acuerdo a la siguiente formula:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso inicial} - \text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100$$

- **Determinación de proteína**

Se colocó 0.5 mL de jugo de granada con un catalizador (10 partes de K_2SO_4 por una parte de $CuSO_4$) y 15 mL de H_2SO_4 concentrado, en un tubo de digestión Kjeldahl. El tubo se colocó en un digestor y este se mantuvo en ebullición durante 2-3 horas hasta que quedó un color verde turquesa transparente, posteriormente este se enfrió a temperatura ambiente. El contenido del tubo fue trasladado a destilación, adicionando 15 ml de agua destilada y colocando en un matraz Erlenmeyer 50 mL de ácido bórico (4%) con 3 gotas de rojo de metilo, para recibir el destilado de la muestra. Finalmente, la muestra destilada se tituló con HCl 0.1 N (AOAC, 2005). El porcentaje de proteína bruta se obtuvo mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Nitrógeno} = \frac{1.4 (V_1 - V_0) N}{P}$$

$$\% \text{ Proteína} = \% \text{ Nitrógeno} \times F$$

Donde:

P= Peso en g de la muestra

V_1 = Volumen de HCl consumido en la valoración (ml)

N= Normalidad de HCl

V_0 = Volumen de HCl consumido en la valoración de un blanco (ml)

F= Factor de conversión para pasar de un contenido de nitrógeno a contenido en proteínas, la mayoría de las proteínas contiene un 16% de N_2 ($100/16=6.25$)

- **Determinación de lípidos**

Se determinó mediante extracción por Soxhlet de acuerdo el método 920.39 (AOAC, 2005). Se pesaron 5 g de muestra y se colocaron en un cartucho de celulosa el cual fue puesto en la boca de un vaso Buchi (previamente puesto a peso constante) el cual contenía 50 ml de hexano. Posteriormente el vaso Buchi se colocó en el equipo de extracción de grasa, el cual calienta el hexano hasta volatilizarlo y condensarlo sobre la muestra, la cual queda sumergida con el disolvente en el fondo del vaso Buchi. Una vez terminado el proceso, los vasos son retirados y se colocan en estufa para evaporar

el solvente y posteriormente pesarlo. El contenido de grasa se determina por diferencia de peso:

$$\% \text{ grasa} = \frac{\text{peso inicial vaso buchi} - \text{peso final vaso buchi}}{\text{peso inicial vaso buchi}} \times 100$$

- **Determinación de cenizas**

El porcentaje de cenizas se determinó con ayuda del método 940.26 (AOAC, 2005), pesando 2 g de jugo de granada en un crisol (puesto a peso contante), posteriormente el crisol con el jugo se secaron a $105 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h en horno, pasado el tiempo la muestra se calcinó en mufla a 550°C hasta que las cenizas fueron color gris o blancas; se dejaron enfriar los crisoles en un desecador para poder ser pesados. El porcentaje de cenizas se calculó por diferencia de peso:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{peso muestra seca (cenizas)}}{\text{peso muestra fresca}} \times 100$$

- **Determinación de fibra**

Se pesaron 2 g de jugo de granada y se transfirió a un vaso de Berzelius, se añadió 200 ml de solución de ácido sulfúrico 0.255 N, el vaso fue calentado en el condensador por 30 minutos. Posteriormente, la solución fue filtrada a través de tela de lino y se realizaron lavados hasta alcanzar un pH neutro con agua destilada caliente, se recogió el residuo y se transfirió a un vaso de Berzelius, se añadió 200 ml de hidróxido de sodio 0.313 N y se colocó en el condensador por 30 min. Más tarde, se filtró y lavo con 25 ml de solución de ácido y 3 porciones de 50 ml de agua destilada caliente. Se añadió 25 ml de etanol, se recogió el residuo y transfirió en un crisol, se secó en estufa por 2-3 h. Pasado el tiempo, se enfrió en desecador y se pesó, se dejó calcinar en mufla a 550°C durante 30 min, se enfrió en desecador y se pesó (AOAC, 2005). El porcentaje de fibra se determinó mediante:

$$\% \text{ fibra} = \left(\frac{\text{peso de crisol con residuo seco} - \text{peso crisol con ceniza}}{\text{peso de muestra}} \right) * 100$$

- **Determinación de carbohidratos totales**

La determinación de carbohidratos totales se realizó por el método 101.92 (AOAC, 2005), el cual fue calculado por diferencia al restarle a 100% la suma de los porcentajes de humedad, proteína, lípidos, cenizas y fibra, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ carbohidratos} = 100 \% - (\% \text{ humedad} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lípidos} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ fibra})$$

- **Determinación de °Brix**

Utilizando un refractómetro digital colocando una gota del jugo de granada en el prisma, posteriormente se cerró y se leyeron los °Brix utilizando la escala del refractómetro (AOAC, 2005).

- **Determinación de pH**

Se midió el pH del jugo de acuerdo al método 981.12 (AOAC, 2005), utilizando un potenciómetro, las determinaciones en cada muestra se llevaron a cabo por triplicado.

6.3.2 Actividad antioxidante del jugo de granada

- **Determinación de la actividad antioxidante por inhibición del radical 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS).**

La actividad antioxidante del jugo de granada se estableció por medio de la metodología de Re et al. (1999), el radical ABTS 7 μM se reaccionó con persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) 2.45 μM , mezclando los dos reactivos a una proporción 1:1, y dejándolos en oscuridad con agitación constante y a temperatura ambiente por 16 h. A continuación, se estabilizó el ABTS diluyendo la solución con etanol al 20 %, para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a 734 nm utilizando un espectrofotómetro. Para evaluar la actividad antioxidante, se mezclaron 2 ml de la solución estabilizada con 200 μl de la muestra del jugo de granada, se dejó reaccionar en oscuridad por 6 min a temperatura ambiente, para posteriormente realizar las mediciones de las

absorbancias en las muestras utilizando un espectrofotómetro a 734 nm. Se calculó el % de inhibición del radical libre ABTS mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia final}} \right) \times 100$$

- **Determinación de la actividad antioxidante por inhibición del radical 1,1 - difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).**

Se determinó la actividad antioxidante del jugo de granada por inhibición del radical DPPH de acuerdo a Brand-Williams et al. (1995), se preparó una solución madre de DPPH 6.1×10^{-5} M diluida en metanol al 80%, para obtener una absorbancia de 0.7 ± 0.02 a una longitud de onda de 515 nm. Para evaluar la actividad antioxidante se mezclaron 2.7 mL de la solución de DPPH estabilizada con 300 μ l de jugo de granada y se dejó reaccionar por 30 min. El % de inhibición del radical libre DPPH se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia final}} \right) \times 100$$

- **Determinación de Fenoles totales**

De acuerdo al método de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), se tomaron 500 μ l de jugo de granada y se mezclaron con 2.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu diluido en agua destilada (1:10), se dejaron reposar por 5 min. Después se agregaron 2.5 mL de una solución de carbonato de sodio al 7.5%, la solución resultante se dejó reposar por 2 h en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se tomaron las absorbancias de las soluciones en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 760 nm. Se preparó una curva de calibración previamente usando diferentes concentraciones de ácido gálico. El contenido de fenoles totales fue expresado por mg equivalentes de ácido gálico/ L de jugo de granada mg EAG/L.

- **Determinación de Antocianinas**

Se realizó por el método de diferencia de pH (Giusti & Wrolstad, 2001). Se prepararon dos buffers, el primero a pH 1 con cloruro de potasio (0.025 M) y el segundo a pH 4.5 con acetato de sodio (4 M). Se tomó 500 μ L de jugo de granada diluido en agua (1:10) y se mezcló con 2 mL del buffer a pH 1 y 2 mL de buffer a pH 4.5, respectivamente, en tubos separados. Los tubos fueron agitados y se dejaron reposar por 15 min, posteriormente se midió la absorbancia para ambos buffers a 510 y 700 nm. Se calculó la absorbancia final a partir de:

$$A=(A_{510nm}-A_{700nm})_{pH1} - (A_{510nm}-A_{700nm})_{pH4.5}$$

Los resultados obtenidos se expresaron como mg/L, con ayuda de la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianina monomérica } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{A \cdot PM \cdot FD \cdot 100}{\epsilon \cdot l}$$

Donde:

A= Diferencia de absorbancias pH 1- pH 4.5

PM= Peso molecular de Cianidina-3 (449.2 g/mol)

FD= Factor de dilución

ϵ = Absortividad molar (26,900 L/cm/mg)

- **Determinación de Flavonoides**

Se preparó una solución de tricloruro de aluminio (AlCl_3) al 2 % en metanol, siguiendo la metodología de Arvouet-Grand et al. (1994). Se colocaron 2mL de jugo de granada diluido en agua destilada (1:10) con 2mL de AlCl_3 previamente preparado, se dejó reposar 20 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Al finalizar el tiempo de reposo, se obtuvieron las absorbancias con ayuda de espectrofotómetro a 415 nm. Se preparó una curva de calibración usando Quercetina a diferentes concentraciones. Los resultados obtenidos se expresaron como mg equivalentes de Quercetina (mgEQ/L) de jugo de granada.

6.4 Elaboración de las películas orales refrescantes

Las películas orales se prepararon por el método de *casting* siguiendo la metodología de Borges et al. (2016) con algunas modificaciones. Se ocupó gelatina y maltodextrina de acuerdo a las concentraciones que se muestran en la tabla 4, se disolvieron en agua destilada a 60°C por 10 min, formando la solución A. Por otra parte, se realizó la solución B, que consistió en mezclar Tween 80 y aceite esencial de menta, disueltos en agua destilada de acuerdo a las concentraciones presentadas en la tabla 4, manteniéndose a 40°C con agitación constante por 10 min. Ambas soluciones se enfriaron a 35°C y se mezclaron, para agregar jugo de granada, de acuerdo a las concentraciones mostradas en la tabla 4, manteniéndose en agitación constante por 10 min a 35°C. La solución se colocó en cajas Petri (diámetro 9 cm) y se dejaron secar a una temperatura de 25 ± 2 °C por 24 h. Después del tiempo de secado, las películas se despegaron de la placa, y se mantuvieron en un desecador con sílica.

Tabla 4. Formulaciones de las películas orales.

Películas orales	Gelatina (%)	Maltodextrina (%)	Tween 80 (%)	Menta (%)	Jugo de granada (mL)	Agua destilada (mL)
Blanco	2	1	0.5	2	--	10
OF1	2	1	0.5	2	3	7
OF2	2	1	0.5	2	4	6
OF3	2	1	0.5	2	5	5

6.5 Propiedades fisicoquímicas de las películas orales refrescantes

6.5.1 Análisis proximal de películas orales

Se determinó humedad, el contenido de proteína, grasa, cenizas y carbohidratos de acuerdo a las metodologías mencionadas en la sección 6.3.1.

6.5.2 Espesor

Se cortaron las películas en tiras de 2 cm x 3 cm, el espesor se midió en 6 puntos diferentes de la película con ayuda de un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón), se obtuvo el espesor medio de las películas orales refrescantes (Cilurzo et al., 2008).

6.5.3 pH de la película

Se tomó una película y se humedeció en 25 ml de agua destilada durante 2 min. El pH se midió tocando el electrodo de un medidor de pH con la superficie de la película humedecida. Se realizó por triplicado (Irfan et al., 2016).

6.5.4 Color

Para la determinación de color, de acuerdo a la metodología por Himani et al. (2021), se utilizó un colorímetro CM-508d (Minolta, Tokio, Japón), de las cuales se analizaron los parámetros L* (luminosidad), a* (rojo-verde) y b* (amarillo-azul).

6.5.5 Tiempo de disolución de las películas orales refrescantes

La solubilidad y liberación de compuestos bioactivos se determinó de acuerdo a Himani et al. (2021) con modificaciones. Se utilizó un buffer de fosfato (2.38 g Na₂HPO₄, 0.19 g KH₂PO₄ y 8 g NaCl por litro de agua destilada ajustada con HCl a pH 6.8). Se colocaron películas de 2 x 3 cm con 25 ml de buffer de fosfato y se mantuvo en agitación suave a 37 ± 0.5 °C. Se cronometró el tiempo en que la película comenzó a romperse hasta que se disolvió por completo.

6.5.6 Propiedades térmicas por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

La estabilidad térmica de las películas orales refrescantes, se determinó en atmósfera de nitrógeno, acondicionada mediante un equipo de calorimetría diferencial de barrido (DSC) serie Q 2000 con intercooler RCS 90 (TA Instruments; New Castle, Delaware, EE. UU.). Se pesó 5 ± 0.1 mg de la muestra y configurando una capacidad de flujo constante de nitrógeno de 10 ml/min de 25-200 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/ min. Para calibrar el DSC con Indio (punto de fusión de 156.6°C, ΔH=28.5 J/g) como metal patrón. La temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó tomando

la primera derivada de los termogramas. Tg indicó la línea de base del gráfico DSC en la transición vítrea y es el punto medio de los pasos (Nair et al., 2013).

6.5.7 *Análisis de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)*

El análisis espectral de la película delgada oral se visualizó usando FTIR equipado con un accesorio de reflectancia total atenuada (ATR) para un mejor contacto óptico entre los componentes. Se realizaron 16 escaneos en el rango espectral de 400 a 4000 cm^{-1} con una resolución de 2 cm^{-1} a temperatura ambiente (Himani et al., 2021).

6.6 Determinación de actividad antioxidante

6.6.1 *Extracción de compuestos bioactivos de las películas orales*

Se realizó de acuerdo a la metodología de Espino-Manzano et al. (2020). Se disolvió 1 g de película en 10 ml de agua destilada, se sometió a baño ultrasónico a 20°C por 30 min y posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm a 4°C durante 20 min; el sobrenadante se mantuvo en un tubo de ensayo con tapón protegido de la luz. El sobrenadante fue utilizado para evaluar su acción antioxidante ante la determinación de fenoles, flavonoides, antocianinas, e inhibición de radicales ABTS y DPPH, mediante las metodologías mencionadas en la sección 6.3.2.

6.7 Análisis estadístico

Se utilizó un experimento de diseño aleatorio considerando tres repeticiones por experimento. El análisis estadístico utilizó un ANOVA y pruebas de Tukey ($p \leq 0.05$). Los datos fueron procesados con el software SPSS v25.

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Caracterización del jugo de granada

7.1.1 Caracterización químico proximal del jugo de granada

Los resultados del análisis químico proximal se muestran en la tabla 5. Se obtuvieron valores de 90.63 ± 2.28 % de humedad, 0.42 ± 0.12 % de proteína, 0.18 ± 0.01 % de grasa, 0.20 ± 0.03 % de cenizas y 8.52 ± 2.36 de carbohidratos. Estos valores se encuentran cercanos a los valores reportados por Uzuner (2020), quien obtuvo 85.95% de humedad, 0.15% de proteína, 0.29% de grasa, 0.1% de fibra y 12.65 % de carbohidratos en un análisis fisicoquímico para cultivares de granada. Cabe destacar que no se detectó contenido de fibra en el jugo de granada obtenido, esto se pudo deber a que la fibra en frutas se encuentra principalmente en la cascara y el jugo fue obtenido a partir de los arilos de la granada, influyendo al determinar este parámetro (Berdeja et al., 2019).

El jugo de granada presentó un pH de 2.91 ± 0.02 y ° Brix de 15.72 ± 0.07 , encontrándose dentro del rango de pH 2.8-3.6 y 13-16 °Brix reportados por P. Kandyliis and E. Kokkinomagoulos (2020) en jugo de granada de la variedad Wonderful.

Las variaciones en los resultados obtenidos se pueden deber a la etapa de maduración de la fruta y el tipo de extracción del jugo son factores que pueden interferir en las características finales del jugo (Ejjilani et al., 2022).

Tabla 5. Caracterización del jugo de granada.

Parámetro	Contenido
pH	2.91 ± 0.02
°Brix	15.72 ± 0.07
Humedad (%)	90.63 ± 2.28
Proteína (%)	0.42 ± 0.12
Grasa (%)	0.18 ± 0.01
Fibra (%)	N/D
Cenizas (%)	0.20 ± 0.03
Carbohidratos (%)	8.52 ± 2.36

7.1.2 Actividad antioxidante del jugo de granada

La actividad antioxidante del jugo de granada fue determinada mediante la inhibición del radical ABTS y DPPH, así como la determinación de Fenoles totales, Flavonoides y Antocianinas, los valores obtenidos se presentan en la tabla 6.

Para el caso de inhibición con el radical ABTS, se encontró 99.10 ± 0.33 %, este valor fue superior al obtenido por Bopitiya and Madhujith (2015) quienes reportaron una inhibición del 72.73-93.1% para extractos de jugo de granada obtenidos de arilos para diversos cultivares de Asia. Para el método de inhibición del radical DPPH se encontró 90.58 ± 2.98 %, el cual resultó mayor a lo presentado por Kaoutar et al. (2022) obteniendo 53% en jugos de granada de la variedad “Sefri” y “Wonderful” obtenidos mediante arilos congelados. La capacidad antioxidante del jugo de granada se debe al contenido de compuestos fenólicos, dentro de los cuales se pueden encontrar a flavonoides, como taninos hidrolizables y antocianinas (Fernandes et al., 2017).

El contenido de fenoles totales fue de 1117.33 ± 5.00 mg GAE/L, este valor se encuentra dentro del rango obtenido por Gözlekçi et al. (2011) reportando de 784.4 a 1551.1 mg GAE/L en jugos de granada a partir de arilos. Sin embargo, el valor obtenido en esta investigación fue inferior a lo indicado por Hmid et al. (2017) quienes realizaron una comparación del contenido de compuestos fenólicos en diferentes cultivares de granada, obteniendo 1284 a 9476 mg GAE/L.

Para flavonoides, totales se obtuvo 572.47 ± 17.09 mg EQ/L, lo cual fue similar a lo reportado por El Kar et al. (2011), los cuales encontraron de 135 a 636 mg EQ/L en jugos de granada de diversas variedades en el Mediterráneo.

El contenido de antocianinas fue de 177.92 ± 7.14 mg C3G/L, este valor fue similar a lo encontrado por Hmid et al. (2017) con 178.79 mg C3G/L en jugo de granada de la variedad Wonderful. Sin embargo, presentó un menor contenido de antocianinas a lo reportado por Gil et al. (2000), 387.4 mg C3G/L en jugos de la misma variedad.

La variación en los resultados obtenidos, se pudo deber a la variedad y maduración de la fruta. Autores como Labbe et al. (2016) en su investigación encontraron que la variedad de granada tuvo influencia con respecto a propiedades fisicoquímicas y actividad antioxidante en comparación a la etapa de madurez de la fruta.

Así mismo, el método de extracción del jugo puede interferir en la capacidad antioxidante, pues al prensar la fruta completa se pueden extraer compuestos bioactivos de la cascara (Hmid et al., 2017). Gözlekçi et al. (2011) indican una mayor cantidad de compuestos fenólicos en jugos de granada obtenidos del fruto completo. La mayor capacidad antioxidante del jugo de granada se le atribuye a la punicalagina (que es un elagitanino, un compuesto fenólico), la cual se encuentra principalmente en la cáscara (Gil et al., 2000).

Tabla 6. Evaluación de actividad antioxidante del jugo de granada (*P. granatum*) obtenido por método de prensado manual.

Evaluación antioxidante	Contenido
Inhibición radical ABTS	99.10 ± 0.33 %
Inhibición radical DPPH	90.58 ± 2.98 %
Fenoles totales	1117.33 ± 5.00 (mg GAE/L)
Flavonoides totales	572.47 ± 17.09 (mg EQ/L)
Antocianinas totales	177.92 ± 7.14 (mg C3G/L)

7.2 Propiedades fisicoquímicas de las películas orales refrescantes

7.2.1 Análisis proximal en películas orales

Las películas orales fueron sometidas a un análisis proximal (Tabla 7). Con respecto al contenido de humedad, se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los diferentes tratamientos, encontrando un mayor porcentaje de humedad para OF3 0.176 ± 0.017 % con respecto al Blanco, quien obtuvo el menor porcentaje con 0.017 ± 0.001 . Destacando que conforme se aumenta el contenido de jugo de granada en las formulaciones de las películas orales, el contenido de humedad va incrementando, esto podría deberse a un mayor contenido de compuestos hidrofílicos que presenta el jugo (Panagiotis Kandylis & Evangelos Kokkinomagoulos, 2020).

Tabla 7. Análisis proximal en películas orales.

Películas orales	% Humedad	% Proteína	% Grasa	% Cenizas	% Carbohidratos
Blanco	0.017 ± 0.001 ^d	31.659 ± 0.498 ^a	1.661 ± 0.116 ^a	0.657 ± 0.003 ^b	66.007 ± 0.586 ^c
OF1	0.103 ± 0.009 ^c	13.955 ± 0.642 ^b	1.706 ± 0.117 ^a	1.222 ± 0.111 ^a	83.015 ± 0.809 ^b
OF2	0.144 ± 0.127 ^b	11.000 ± 0.191 ^c	1.856 ± 0.118 ^a	1.293 ± 0.096 ^a	85.707 ± 0.211 ^a
OF3	0.176 ± 0.017 ^a	10.134 ± 0.118 ^c	1.712 ± 0.119 ^a	1.232 ± 0.108 ^a	86.746 ± 0.260 ^a

a, b, c, d indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

En cuanto al contenido de proteína, se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los diferentes tratamientos, encontrando un mayor contenido de proteína para el Blanco con 31.659 ± 0.498 % y un menor para OF3 con 10.134 ± 0.118 %. Cabe destacar que la película con mayor porcentaje de proteína fue el tratamiento Blanco, el cual se encuentra elaborado de gelatina, de acuerdo a Aykin-Dinçer et al. (2017) el contenido de proteína en gelatina bovina comercial oscila entre 88.45 %, lo cual concuerda con los valores obtenidos. Es importante resaltar que, al adicionar jugo de granada a las diferentes formulaciones, se notó un decrecimiento en el contenido de proteína, esto pudiera deberse a una desnaturalización de la proteína ocasionada por el pH del jugo de granada. El pH afecta a las proteínas ocasionando una ruptura de los enlaces no covalentes en su estructura, causando una pérdida en la función de la

proteína en las cadenas de gelatina debido al pH que presenta el jugo de granada (Kishore et al., 2012).

Para el contenido de grasa, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los diferentes tratamientos, sin embargo, se pueden observar valores entre $1.661 \pm 0.116 \%$ y $1.856 \pm 0.118 \%$ para Blanco y OF2 respectivamente. Los valores obtenidos para los tratamientos con OF1, OF2 y OF3, se pudieron ver influenciados por el contenido de grasa que presentó el jugo de granada (0.18%). Además, estos valores se le pueden atribuir a la presencia de ácidos grasos presentes en el aceite esencial de menta.

Para el contenido de cenizas no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en los tratamientos con jugo de granada, pero si con respecto al blanco, quien presentó el menor porcentaje de cenizas con $0.657 \pm 0.003 \%$, destacando que al incrementar el contenido de granada el porcentaje de cenizas fue mayor $1.293 \pm 0.096 \%$ para OF2. Esto valores se pueden ver afectados por el contenido de minerales que presenta el jugo de granada ($0.20 \pm 0.03 \%$), así como en la gelatina. De acuerdo a Aykin-Dinçer et al. (2017), en gelatina de bovino se encuentra 1.22% de contenido de ceniza, lo cual concuerda con los datos obtenidos.

El contenido de carbohidratos fue mayor para los tratamientos con jugo de granada, encontrando un mayor contenido para OF3 con $86.746 \pm 0.260 \%$ y para el blanco se encontró el menor con $66.007 \pm 0.586 \%$, estos valores se vieron influenciados por el contenido de carbohidratos que presenta el jugo de granada ($8.52 \pm 2.36\%$), además de la incorporación de maltodextrina, la cual es un carbohidrato (Hofman et al., 2016).

Los valores obtenidos fueron similares a los encontrados por Rodríguez et al. (2020) quienes caracterizaron películas comestibles a base de papaya con *Moringa oleifera* y ácido ascórbico, quienes evidenciaron el poder nutricional en sus películas debido a la incorporación de compuestos antioxidantes y altos porcentajes de carbohidratos, que oscilaron entre 71 y 85% .

7.2.2 Espesor

En la tabla 8 se presentan los valores obtenidos con respecto a la caracterización fisicoquímica en las películas orales. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el Blanco y los tratamientos con jugo de granada. Los espesores fueron de 0.037 ± 0.005 y 0.047 ± 0.001 mm para el Blanco y OF3, respectivamente. Estos valores se encuentra dentro del rango ideal para películas orales de acuerdo a Bala et al. (2013) quienes mencionan que deben de ser de 0.005 mm a 0.2 mm. Así mismo, mencionan que, en películas con espesores bajos, las moléculas de agua pueden entrar con mayor facilidad en la matriz polimérica beneficiando a la desintegración de la película. La presencia de variaciones en los espesores al adicionar de jugo de granada, se puede deber a una separación en los enlaces intermoleculares ocasionada por sólidos presentes en el jugo de granada. Un comportamiento similar fue observado por Lim and Hadinoto (2021) en películas a base de almidón adicionadas con diferentes concentraciones de curcumina. Los espesores reportados fueron de 0.3 mm a 0.35 mm indicando una acumulación de curcumina en las cadenas poliméricas de la película.

Tabla 8. Caracterización fisicoquímica de las películas orales.

Películas orales	Espesor (mm)	pH
Blanco	0.037 ± 0.005 ^b	6.830 ± 0.260 ^a
OF1	0.046 ± 0.001 ^a	3.557 ± 0.384 ^b
OF2	0.047 ± 0.001 ^a	3.800 ± 0.040 ^b
OF3	0.047 ± 0.001 ^a	4.000 ± 0.040 ^b

^{a, b} indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

7.2.3 pH de la película oral

En cuanto al parámetro pH, las películas no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos que contenían jugo de granada. Sin embargo, el blanco reportó un valor de pH más alto de 6.830 ± 0.260 . La adición de jugo de granada disminuyó el pH a 3.557 ± 0.384 , esto se pudo ver afectado por el bajo pH que presenta

el jugo de granada, pues su pH oscila entre 2.8 - 3.6 (Panagiotis Kandylis & Evangelos Kokkinomagoulos, 2020). Pimparade et al. (2017) reportaron pH de 2.9–3.4 en películas adicionadas con ácido cítrico, indicando que un pH bajo podría generar un mayor flujo salival, ocasionando una rápida desintegración en las películas orales.

7.2.4 Color

La determinación de color en películas es un factor importante, ya que influye en la aceptación del consumidor (Sevinç Özakar & Özakar, 2021). En la tabla 9 se observan las coordenadas del espacio de color. El parámetro L^* indica la luminosidad en las películas, valores más cercanos a 100 nos indica una mayor luminosidad. Se encontraron valores de 87.518 ± 1.034 para el blanco y conforme se adiciono jugo de granada, los valores fueron disminuyendo, de 83.294 ± 1.133 a 74.858 ± 1.424 para OF1 Y OF3, respectivamente. Para croma a^* , que indica colores verdes a rojizos, se encontraron valores positivos, indicando colores rojizos. Con respecto al croma b^* , que indica colores azules a amarillos, se encontraron valores positivos indicando una tendencia al color amarillo. Se puede notar que la luminosidad en las películas disminuyo con la adición de jugo de granada y que el color rojo predomino. Esto se puede deber a la presencia de antocianinas en el jugo de granada, estos polifenoles son responsables de colores naranjas, morados y rojizos en frutas y plantas (Hanani et al., 2019).

Se puede apreciar que las películas orales presentaron colores rosados casi transparentes, valores similares fueron los reportados por Kumar et al. (2019), para películas a base de quitosano y pululano adicionada con cascara y jugo de granada.

Tabla 9. Determinación de color en películas orales.

Películas orales	L*	a*	b*
Blanco	87.51 ± 1.03 ^a	0.40 ± 0.18 ^d	5.40 ± 0.24 ^a
OF1	83.29 ± 1.13 ^b	7.95 ± 1.31 ^c	4.24 ± 0.50 ^b
OF2	77.37 ± 0.97 ^c	10.13 ± 0.67 ^b	3.19 ± 0.50 ^c
OF3	74.85 ± 1.42 ^d	14.61 ± 1.00 ^a	1.25 ± 0.20 ^d

a, b, c, d indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

7.2.5 Tiempo de desintegración

Las películas orales se administran en la cavidad oral, al entrar en contacto con la saliva éstas se hidratan y se disuelven rápidamente, liberando compuestos activos que pueden ser absorbidos por la mucosa oral (Speer et al., 2018). Es importante la desintegración completa de las películas orales en tiempos cortos para evitar una asfixia y proporcionar una buena sensación en la boca (Low et al., 2015).

En la figura 5 se muestra el tiempo de disolución de las películas orales, en donde se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en las diferentes formulaciones. Se encontró un menor tiempo para OF3 con 28.333 ± 3.512 s y un mayor tiempo para el Blanco con 52.333 ± 3.055 s. El tiempo de desintegración puede verse afectado tanto por el espesor en las películas, así como a su naturaleza hidrofílica (Pimparade et al., 2017). Cabe destacar que, al aumentar la concentración de jugo de granada, el tiempo de desintegración fue menor, esto se puede deber a un incremento de compuestos hidrófilos en la interacción de la matriz polimérica, debilitando los puentes de hidrogeno formados, beneficiando la disolución de las películas (Dixit & Puthli, 2009).

Los resultados obtenidos en la presente investigación fueron inferiores a los obtenidos por Himani et al. (2021), quienes encontraron tiempos de desintegración de 44-48 s en películas a base de maltodextrina, quitosano y pululano con extracto acuoso de ajo. Sin embargo, Borges et al. (2016) encontró tiempos de desintegración de 18.9 a 25.3 s para películas orales de lecitina, gelatina y colágeno hidrolizado con extracto etanólico de propóleo, estos valores fueron inferiores a los encontrados en esta investigación, atribuyendo este comportamiento a la hidrofilia y bajo peso molecular

del colágeno hidrolizado. De igual forma, Prajapati et al. (2018) encontraron menores tiempos de desintegración que van de 16.40 a 24.23 s para películas orales a base de pululano con zolmitriptan, destacando que el pululano es un polímero con una alta solubilidad además de la adición de plastificante que mejor la desintegración en la película.

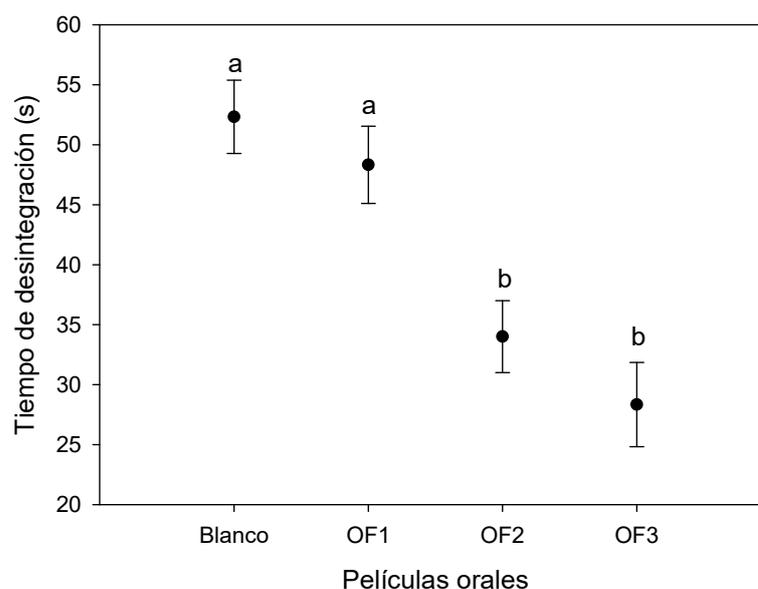


Figura 5. Tiempo de desintegración en películas orales. ^{a, b} indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

7.2.6 Propiedades térmicas por Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La figura 6 muestra el termograma de las películas orales, mostrando una temperatura de transición vítrea de 93.89 °C para Blanco y para los tratamientos con jugo de granada 53.26 °C, 58.06 °C y 63.07 °C para OF1, OF2 y OF3, respectivamente. La transición vítrea indica un cambio de estado vítreo a gomoso en la estructura de las películas, lo que puede tener una relación con el estado amorfo de la matriz polimérica. Además, se puede observar un cambio en el pico endotérmico bien definido para Blanco con una temperatura de fusión de 101.95 °C. Sin embargo, este pico fue menos pronunciado para los tratamientos OF1, OF2 y OF3 con temperaturas de fusión de 63.83 °C, 64.79 °C y 78.61 °C, respectivamente. A este evento se le podría atribuir la pérdida de agua estructural, debido a la naturaleza hidrofílica que presentan las

películas orales (Panraksa et al., 2020). De acuerdo a ΔH se obtuvieron valores de 5.17 J/g para Blanco y 2.29 J/g, 1.63 J/g y 0.29 J/g para OF1, OF2 y OF3, respectivamente, lo que nos indicaría que se requiere menos energía para destruir la estructura cristalina de la película para las películas con jugo de granada con respecto al Blanco. Las películas con jugo de granada presentan una menor estabilidad en la matriz polimérica, debido a la mayor presencia de compuestos hidrofílicos, beneficiando la solubilidad de las películas orales. Además de corroborar la fragmentación de los enlaces no covalentes en las cadenas poliméricas, debido al pH ácido del jugo, ocasionando un estado amorfo en las películas orales (Kishore et al., 2012).

Un comportamiento similar fue observado por Kumar et al. (2021) para películas a base de quitosano con extracto de cascara de granada, en donde la T_g en las películas disminuyó al adicionar extracto de cascara de granada, la disminución en la T_g nos indica que se requiere un menos calor para que las cadenas poliméricas pasen de un estado rígido a uno amorfo, mejorando la solubilidad de las películas.

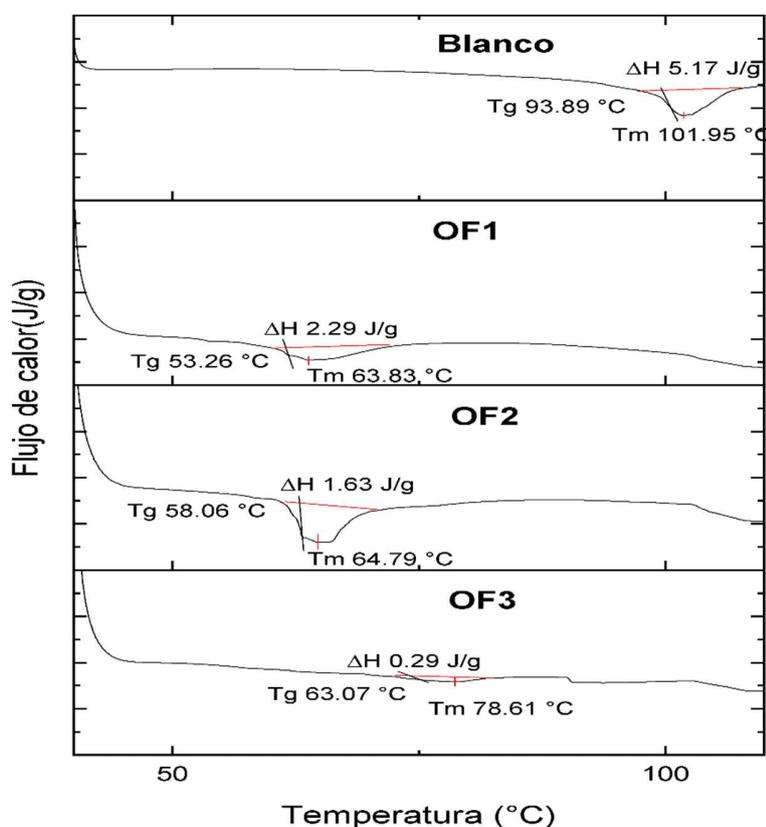


Figura 6. Propiedades térmicas por calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) en películas orales.

7.2.7 Análisis por FTIR

La figura 7 se muestran los espectros por FTIR de las películas orales, en ella se puede observar que no existió la presencia de nuevos picos en la formulación de las películas, sin embargo, si presentaron variaciones en las intensidades de absorción en los diferentes tratamientos. Las películas elaboradas con jugo de granada mostraron una disminución en la intensidad de las bandas, esto pudo ser causado por una interferencia en los enlaces ocasionada por el jugo de granada (Bodini et al., 2020). Se observan las bandas características de la gelatina en los cuatro tratamientos, los picos entre 3269 y 3275 cm^{-1} corresponden al estiramiento del grupo amino (-NH) de la amida A, a 2927 y 2932 cm^{-1} que se deben al estiramiento de CH y NH_3 , a 1636 y 1647 cm^{-1} se presentan vibraciones de estiramiento de grupo carbonilo C=O

característico de la amida I, a 1544 y 1554 cm^{-1} se asocia a vibraciones de flexión de grupos N-H y vibraciones de estiramiento de grupo C-N pertenecientes de la Amida II y a 1239 y 1244 cm^{-1} indican vibraciones en C-N y N-H o vibraciones de grupo CH_2 de la glicina pertenecientes a la amida III. Bhatia et al. (2023) en películas a base de gelatina de porcinos y bovinos adicionadas con aceites esenciales, encontraron picos similares a los reportados en esta investigación, a 3292 cm^{-1} asociado a la amida A, a 3070 cm^{-1} para la amida B, a 1640 cm^{-1} la amida I, a 1549 cm^{-1} la amida II y a 1239 cm^{-1} la amida III.

En la región de 1200 a 900 cm^{-1} se encontraron bandas asociadas a los carbohidratos. Los picos más intensos ubicados entre 1022 y 1030 cm^{-1} corresponden a la vibración de estiramiento del enlace C-O en el grupo C-OH y al estiramiento del enlace C-C en la estructura de carbohidratos como glucosa y fructosa, que se encuentran presentes en la maltodextrina y jugo de granada. Matwijczuk et al. (2022) en su investigación para estimar mediante FTIR portadores como maltodextrina para obtener miel en polvo secada por aspersión, ubicaron picos similares en la región cercana a 1027 cm^{-1} atribuyéndolo a la estructura de los carbohidratos. Corripio et al. (2017) desarrollaron películas a base de quitosano y jugo de granada, encontraron en el análisis de FTIR picos entre 1034 y 1080 cm^{-1} , así como en 1063 cm^{-1} y entre 1055 y 1138 cm^{-1} , asociando estos a azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa del jugo de granada.

En la región entre 1337 y 1449 cm^{-1} se encontraron picos que revelan la presencia del grupo $=\text{CH}_2$ de algunos terpenos en el aceite esencial de menta. Agatonovic-Kustrin et al. (2020) evaluaron la calidad y pureza de aceites esenciales mediante espectrometría FTIR, ubicando entre 1330 y 1410 cm^{-1} componentes de los aceites esenciales. Los picos observados entre 2927 y 2932 cm^{-1} , también podrían indicar la presencia de aceites esenciales como la menta, debido al estiramiento de C-H y CH_2 , característico en estos. De acuerdo a Taylan et al. (2021) encontró vibraciones a 2921 cm^{-1} , 2870 cm^{-1} y entre 1700 a 700 cm^{-1} para aceite esencial de menta de tres variedades.

En las bandas entre 1239 y 1244 cm^{-1} está asociado a los enlaces C-O donde ocurre el estiramiento del ácido y entre 918 y 931 cm^{-1} el enlace O-H representando la deformación de ácidos. Además, en los picos arrojados entre 3269 y 3275 cm^{-1} y entre

2927 y 2932 cm^{-1} se pueden deber a grupos OH y C-H₃, los cuales podrían indicar la presencia de compuestos fenólicos, como flavonoides. En la región denominada “huella dactilar”, se muestran picos entre 777 a 849 cm^{-1} , los cuales se asignan a la vibración de anillos aromáticos de las antocianinas (Bhushan et al., 2023; Favaro et al., 2018). De acuerdo a Corripio et al. (2017) encontraron picos similares entre 2940 cm^{-1} en jugo de granada.

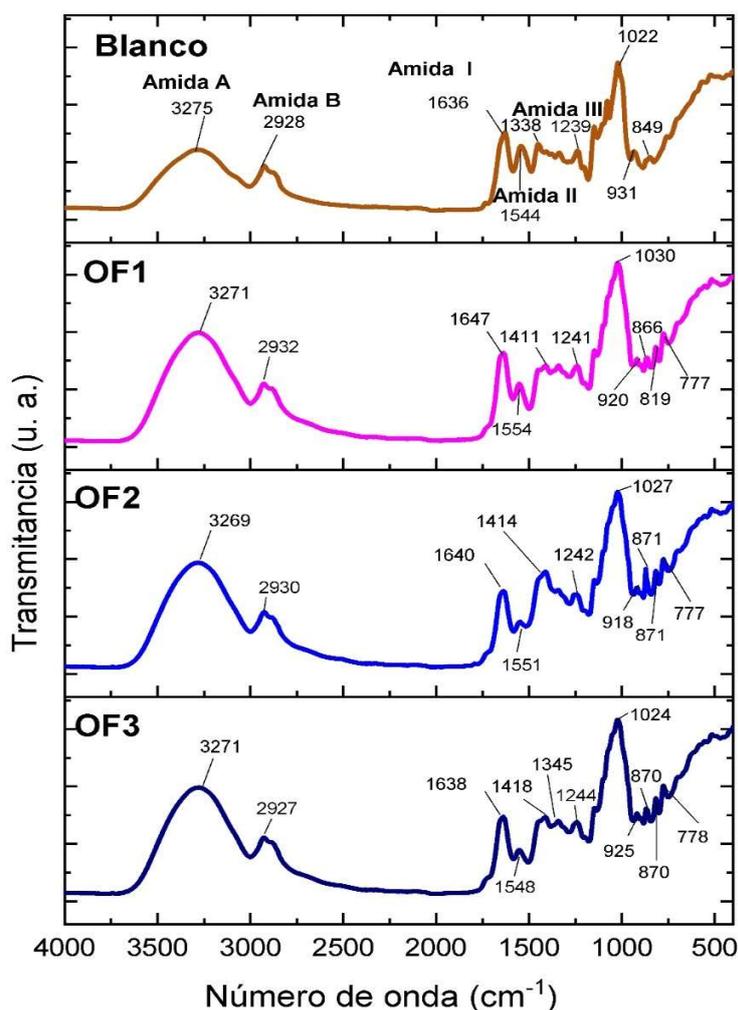


Figura 7. Análisis FTIR en películas orales.

7.2.8 Actividad antioxidante en películas orales

Para esta investigación se determinó la actividad antioxidante en las películas orales de mediante la eliminación de radicales ABTS y DPPH. La figura 8 muestra el porcentaje de inhibición con el radical ABTS, en donde se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los tratamientos con jugo de granada con respecto al Blanco. Se encontraron valores de 30.29 ± 1.01 % a 89.70 ± 0.54 % para Blanco y OF3, respectivamente. Los valores altos obtenidos para las películas OF1, OF2 y OF3, tuvieron relación con la actividad antioxidante que presentó el jugo de granada (99.10 %). Los valores obtenidos fueron superiores a los reportados por Hanani et al. (2019) para películas a base de gelatina con diferentes concentraciones de cascara de granada, reportando actividad antioxidante por inhibición del radical ABTS de 80.02 a 32.01 %.

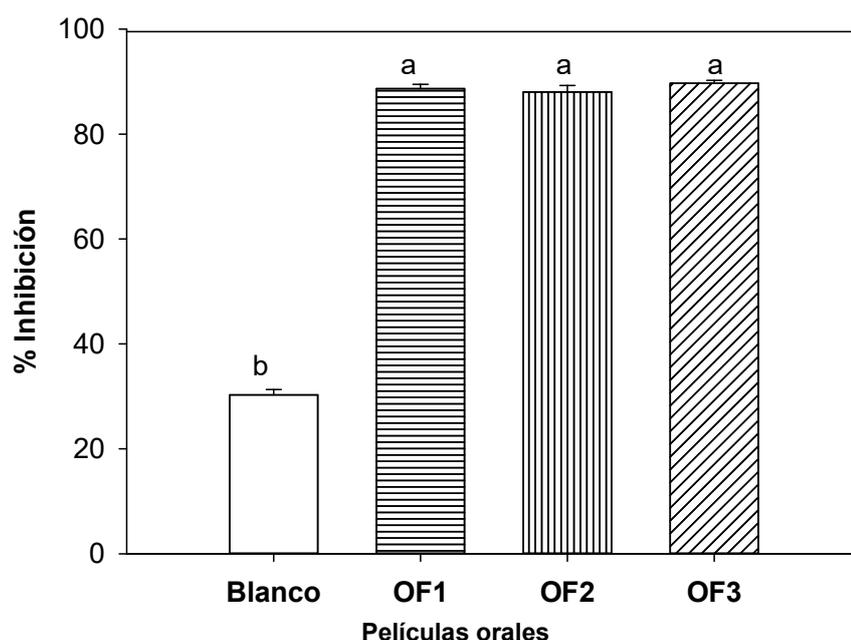


Figura 8. Actividad antioxidante por porcentaje de inhibición del radical ABTS en las películas orales.

a, b indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$)

Para el radical DPPH hubo diferencias significativas ($p \leq 0.5$) en los cuatro tratamientos, se puede observar en la figura 9. Se encontraron valores que van de 10.65 ± 0.54 a

68.14 ± 1.57 % para el blanco y OF3, respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos por Kumar et al. (2021) para películas de quitosano con extracto de cascara, reportando actividad antioxidante por inhibición del radical DPPH que van de 23.13 a 76.84 % a diferentes concentraciones de extracto.

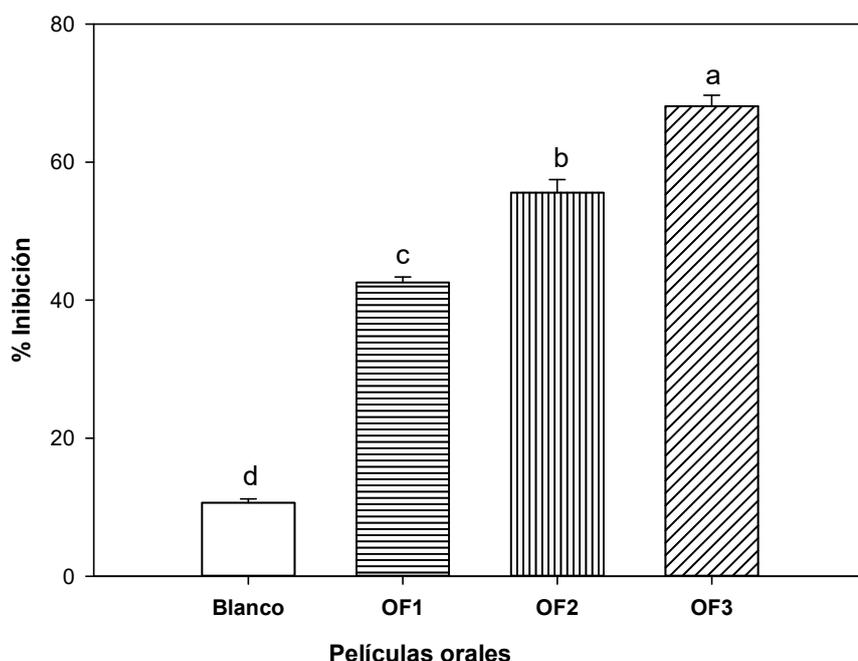


Figura 9. Actividad antioxidante por porcentaje de inhibición del radical DPPH en las películas orales.

a, b, c, d indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

La actividad antioxidante de las películas orales está asociada a la presencia de compuestos fenólicos que se encuentran en el jugo de granada, como taninos hidrolizables y flavonoides (Melgarejo-Sánchez et al., 2021).

Además, se puede notar que el Blanco también presentó actividad antioxidante, esto se puede deber a la presencia de aceite esencial de menta y a la gelatina. De acuerdo a Wu et al. (2019) el aceite esencial de menta, presenta actividad antioxidante debido a monoterpenoides, dentro de los cuales se encuentran el mentol, carvona y 1,8-cineol. Liu et al. (2020) en películas activas de quitosano con aceites esenciales, encontraron actividad antioxidante con aceite esencial de menta, reportando 66.79 % mediante la inhibición del radical DPPH. Con respecto a la gelatina, la actividad antioxidante está

relacionada a péptidos bioactivos, los cuales están relacionados a su composición de aminoácidos, como glicina y prolina (Gómez-Guillén et al., 2011). Bhatia et al. (2023) reportaron actividad antioxidante mediante la inhibición de radicales ABTS y DPPH para películas comestibles de gelatina de origen porcino y bovino, atribuyendo este hallazgo a fracciones peptídicas y aminoácidos.

El contenido de fenoles totales en las películas orales se muestra en la figura 10, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los diferentes tratamientos. Los valores obtenidos van de 4.9 ± 0.67 a 43.46 ± 1.26 mg GAE/g de película, estos valores demostraron la presencia de compuestos fenólicos en mayor presencia para las películas con jugo de granada, sin embargo el blanco también presentó compuestos fenólicos, esto se puede deber a compuestos fenólicos que se encuentran en terpenoides y fenilpropanoides del aceite esencial de menta (Wu et al., 2019). Borges and De Carvalho (2015) reportaron valores que van de 41.5 a 62.5 mg GAE/ g en película en películas orales a base de colágeno hidrolizado y extracto etanólico de propóleo.

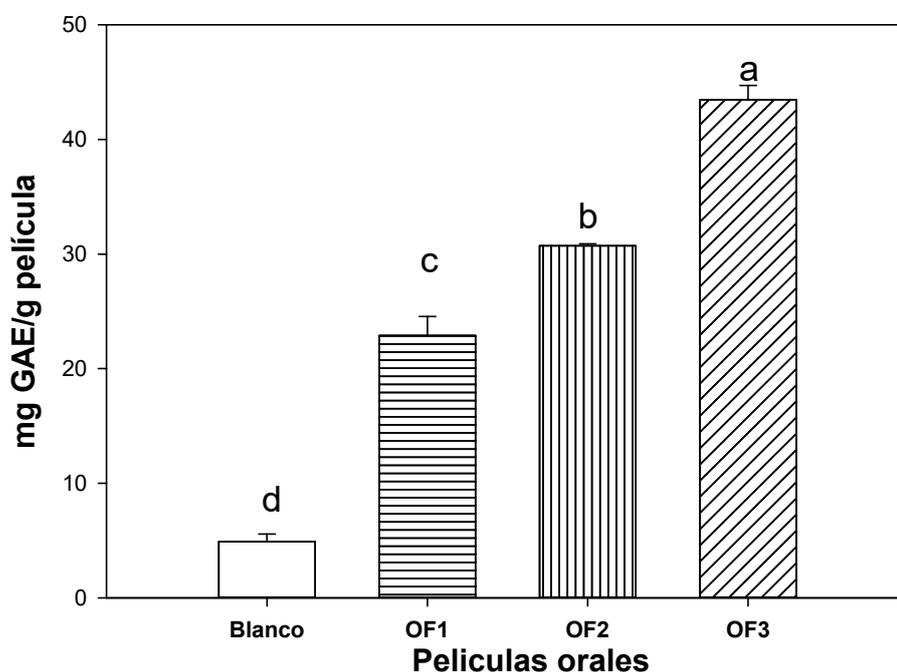


Figura 10. Contenido total de fenoles en películas orales.
a, b, c, d indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

El contenido de fenoles nos puede indicar la capacidad antioxidante que presenta alguna fuente natural, sin embargo, es importante conocer el contenido de compuestos fenólicos como flavonoides y antocianinas. En cuanto al contenido de flavonoides se puede observar en la figura 11, que se presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre el blanco y los tratamientos con jugo de granada. Se puede destacar un mayor contenido de flavonoides en las películas con jugo de granada, haciendo notar la presencia de este grupo de metabolitos secundarios, entre los que podrían encontrarse catequina, epicatequina, kaempferol, quercetina, luteolina, rutina y antocianinas (Melgarejo-Sánchez et al., 2021). La película control también presentó contenido de flavonoides, pues de acuerdo a Fialová et al. (2015) se pueden encontrar flavonoides como eriodictiol, luteolina, apigenina y sus glucósidos en el aceite esencial de menta, lo que pudo estar relacionado a los datos obtenidos. Mabrouk et al. (2019) encontraron valores de 23.1 a 28.8 mg EQ/ g para el contenido total de flavonoides en películas a base de pectina con extracto de cascara y semilla de granada.

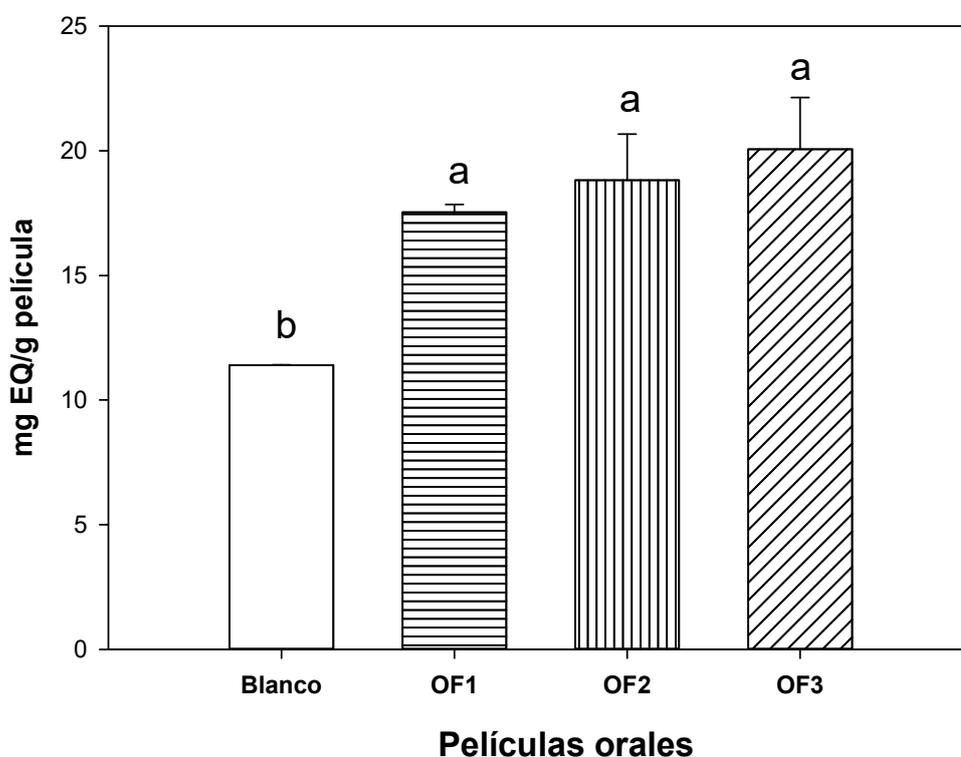


Figura 11. Contenido de flavonoides presentes en películas orales
^{a, b} indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

Para el contenido de antocianinas, en la figura 12 se muestran los resultados obtenidos, encontrando diferencias significativas ($p \leq 0.5$) en los tratamientos con jugo de granada, encontraron valores que van desde 9.95 ± 0.87 a 13.24 ± 0.18 mg C3G/g de película, para OF1 y OF3, respectivamente, destacando que en el blanco no se encontró contenido de antocianinas. Las antocianinas son responsables del color rojo característico del jugo de granada y de sus semillas, además de ser responsables de presentar actividad antioxidante, junto a los taninos hidrolizables y al ácido elágico (Gil et al., 2000; Melgarejo-Sánchez et al., 2021). Los resultados obtenidos en esta investigación fueron inferiores a los reportados por Otálora González et al. (2022) encontraron un contenido de antocianinas de 37.9 mg C3G/g en películas a base de almidón de yuca con col lombarca.

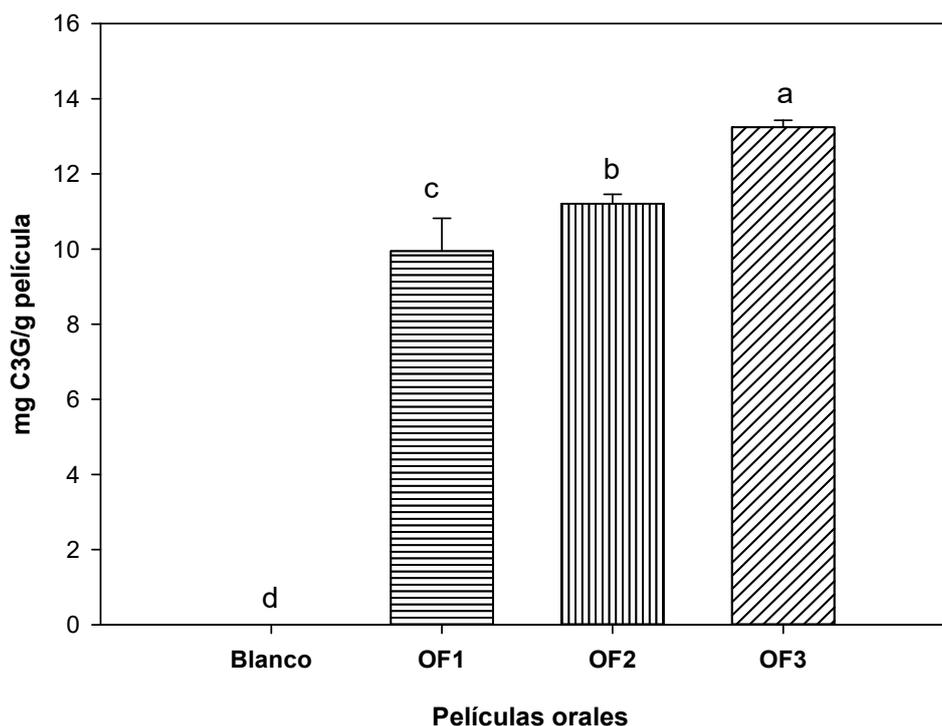


Figura 12. Contenido de antocianinas en películas orales
a, b, c, d indican diferencias significativas por prueba Tukey ($p \leq 0.5$).

8 CONCLUSIONES

Se realizó la elaboración y caracterización de las películas orales refrescantes a base de gelatina con propiedades antioxidantes, donde el análisis proximal en las películas nos mostró que la incorporación del jugo de granada en la elaboración de las películas orales afectó significativamente el valor nutricional en la película, obteniendo un alto porcentaje de carbohidratos que osciló entre $66.007 \pm .0586$, 83.015 ± 0.809 , 85.707 ± 0.211 , 86.746 ± 0.260 en los tratamientos Blanco, OF1, OF2 y OF3, respectivamente. De acuerdo a la caracterización fisicoquímica en las películas orales se pudo destacar que tanto el pH, así como el espesor y los compuestos hidrofílicos afectan el tiempo de desintegración en las películas orales. En cuanto al color, el parámetro L^* las películas arrojaron valores de 74.85 ± 1.42 a 87.51 ± 1.03 , para el croma a^* se obtuvieron valores positivos entre 7.95 ± 1.31 a 14.61 ± 1.00 y para el croma b^* de 1.25 ± 0.20 a 4.24 ± 0.50 indicando películas rosadas casi transparentes.

El análisis de DSC nos demostró una buena interacción con los componentes que forman la película oral, el tratamiento Blanco exhibió una mayor T_g de $93.89 \text{ }^\circ\text{C}$ con respecto a OF3 que presentó una disminución de T_g de $63.07 \text{ }^\circ\text{C}$, lo que se vio afectado por los compuestos fenólicos del jugo de granada permitiendo una mejor solubilización de la película.

El análisis FTIR confirmó la interacción en la matriz polimérica, además de la presencia de los compuestos fenólicos del jugo de granada, que son el principal objeto de este estudio.

La actividad antioxidante en las películas orales mostró una buena inhibición ante el radical ABTS con $89.70 \pm 0.54 \%$ y DPPH con $68.14 \pm 1.57 \%$, para el tratamiento OF3. La actividad antioxidante de las películas se ve afectada por compuestos fenólicos, lo cual se comprobó al encontrar un contenido fenólico total de $43.46 \pm 1.26 \text{ mg GAE/g}$, además de un contenido de flavonoides que fue de $20.06 \pm 2.08 \text{ mg EQ/g}$ y para antocianinas de $13.24 \pm 0.18 \text{ mg C3G/g}$ para la película OF3, la cual tuvo una mayor actividad antioxidante.

9 Anexos



Congreso Internacional de Investigación de
Academia Journals Hidalgo 2022

CERTIFICADO

otorgado a

Ing. Jenni Itzel Rosales Celso
Dra. Arely León López
Dr. Rafael Germán Campos Montiel
Dra. Alma Delia Hernández Fuentes
Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

por su artículo titulado

Elaboración de una Película Oral Refrescante a Base de Gelatina con Propiedades Antioxidantes

(Artículo No. HHI032)

La ponencia correspondiente fue presentada en el congreso desarrollado los días 20, y 21 de octubre de 2022, teniendo como sede las magníficas instalaciones de la Universidad Politécnica Metropolitana de Hidalgo. El artículo está incluido en las siguientes publicaciones: (1) en el portal de internet AcademiaJournals.com, con ISSN 1946-5351 online, Vol. 14, No.08, 2022 e indexación en la base de datos [Fuente Académica Plus de EBSCOHOST](#), Massachusetts, Estados Unidos y (2) en el libro digital ebook titulado *Investigación para el Fortalecimiento de la Sociedad- Hidalgo 2022* con ISBN 978-1-939982-78-0 online.

Los organizadores del congreso reconocen la participación de los autores en el congreso, agradeciendo sus contribuciones.



DR. RAFAEL MORAS, P.E.
Editor, Academia Journals



HHI032

Congreso Academia Journals Hidalgo 2022
<https://www.academiajournals.com/Hidalgo>

10 BIBLIOGRAFÍA

- Abril-Ibarra, Z. (2021). Antioxidantes producidos por microorganismos acuáticos y terrestres con uso potencial en cosméticos. *Actualidades Biológicas*, 44(116), 1-19. <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v44n116a02>
- Abruzzo, A., Bigucci, F., Cerchiara, T., Cruciani, F., Vitali, B., & Luppi, B. (2012). Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydr Polym*, 87(1), 581-588. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.024>
- Agatonovic-Kustrin, S., Ristivojevic, P., Gegechkori, V., Litvinova, T. M., & W. Morton, D. (2020). Essential Oil Quality and Purity Evaluation via FT-IR Spectroscopy and Pattern Recognition Techniques. *Applied Sciences*, 10(20).
- Aguirre-Álvarez, G., Foster, T., & Hill, S. E. (2012). Impact of the origin of gelatins on their intrinsic properties. *CyTA - Journal of Food*, 10(4), 306-312. <https://doi.org/10.1080/19476337.2012.658441>
- Ahmed, J. M., Boya, D. A., & Kamal, H. (2020). Formulation of a fast-dissolving oral film using gelatin and sodium carboxymethyl cellulose. *Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci)*, 24(3), 338-346. <https://doi.org/10.15218/zjms.2020.040>
- Al-Nimry, S., Dayah, A. A., Hasan, I., & Daghmash, R. (2021). Cosmetic, Biomedical and Pharmaceutical Applications of Fish Gelatin/Hydrolysates. *Marine drugs*, 19(3), 145. <https://doi.org/10.3390/md19030145>
- Al-Zoreky, N. S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *Int J Food Microbiol*, 134(3), 244-248. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.07.002>
- Alberto Coronado-Reyes, J., Tinoco-Salazar, J., Lizeth Guisa-Morales, M., Jesús CortÉS-Penagos, C., & González-Hernández, J. (2020). Morphology about the varieties mexican pomegranate fruit (*Punica granatum*) and its ripening stage. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. <https://doi.org/10.1590/fst.28620>
- Alkhatib, M., Fayad, C., Badran, A., Hamade, K., Daou, A., Baydoun, E., & Hijazi, A. (2022). Preventive and Therapeutic Effects of *Punica granatum* (Pomegranate) in Respiratory and Digestive Diseases: A Review. *Applied Sciences*, 12(23), 12326. <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/23/12326>
- AOAC. (2005). Official methods of analysis of AOAC international. *Gaithersburg, Md: AOAC International*.

- Arvouet-Grand, A., Vennat, B., Pourrat, A., & Legret, P. (1994). [Standardization of propolis extract and identification of principal constituents]. *J Pharm Belg*, 49(6), 462-468. (Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants.)
- Aykin-Dinçer, E., Koç, A., & Erbas, M. (2017). Extraction and physicochemical characterization of broiler (*Gallus gallus domesticus*) skin gelatin compared to commercial bovine gelatin. *Poult Sci*, 96(11), 4124-4131. <https://doi.org/10.3382/ps/pex237>
- Bala, R., Pawar, P., Khanna, S., & Arora, S. (2013). Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. *International journal of pharmaceutical investigation*, 3(2), 67-76. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.114897>
- Berdeja, M., Chabela, P., Alquicira, P., & Bermúdez, S. (2019). Caracterización bromatológica y microbiológica de la cáscara de granada (*Punica granatum L.*) como fuente de ingredientes funcionales. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4.
- Bhatia, S., Al-Harrasi, A., Jawad, M., Shah, Y. A., Al-Azri, M. S., Ullah, S., . . . Aydemir, L. Y. (2023). A Comparative Study of the Properties of Gelatin (Porcine and Bovine)-Based Edible Films Loaded with Spearmint Essential Oil. *Biomimetics*, 8(2), 172. <https://www.mdpi.com/2313-7673/8/2/172>
- Bhushan, B., Bibwe, B., Pal, A., Mahawar, M. K., Dagla, M. C., Kr, Y., . . . Chaudhary, D. P. (2023). FTIR spectra, antioxidant capacity and degradation kinetics of maize anthocyanin extract under variable process conditions. *Applied Food Research*, 3(1), 100282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.afres.2023.100282>
- Bhyan, B., Jangra, S., Kaur, M., & Singh, H. (2011). Orally fast dissolving films: Innovations in formulation and technology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 9, 50-57.
- Bodini, R. B., Pugine, S. M. P., de Melo, M. P., & de Carvalho, R. A. (2020). Antioxidant and anti-inflammatory properties of orally disintegrating films based on starch and hydroxypropyl methylcellulose incorporated with *Cordia verbenacea* (erva baleeira) extract. *International Journal of Biological Macromolecules*, 159, 714-724. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.05.075>
- Bopitiya, D., & Madhujith, T. (2015). Antioxidant Potential of Pomegranate (*Punica granatum L.*) Cultivars Grown in Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research*, 24(1), 71–81. <https://doi.org/10.4038/tar.v24i1.7990>
- Borges, A. F., Silva, C., Coelho, J. F., & Simões, S. (2015). Oral films: Current status and future perspectives: I - Galenical development and quality attributes. *J Control Release*, 206, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.03.006>

- Borges, J. G., & De Carvalho, R. A. (2015). Orally Disintegrating Films Containing Propolis: Properties and Release Profile. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(4), 1431-1439. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.24355>
- Borges, J. G., Silva, A. G., Cervi-Bitencourt, C. M., Vanin, F. M., & Carvalho, R. A. (2016). Lecithin, gelatin and hydrolyzed collagen orally disintegrating films: functional properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 86, 907-916. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.089>
- 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/doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Briassoulis, D., & Giannoulis, A. (2018). Evaluation of the functionality of bio-based food packaging films. *Polymer Testing*, 69, 39-51. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.polymertesting.2018.05.003>
- Calixto, S., Ganzherli, N., Gulyaev, S., & Figueroa-Gerstenmaier, S. (2018). Gelatin as a Photosensitive Material. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23(8), 2064. <https://doi.org/10.3390/molecules23082064>
- Cilurzo, F., Cupone, I. E., Minghetti, P., Selmin, F., & Montanari, L. (2008). Fast dissolving films made of maltodextrins. *Eur J Pharm Biopharm*, 70(3), 895-900. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2008.06.032>
- Coronado-Reyes Jesús Alberto, T.-S. J., Guisa-Morales, Cortés-Penagos Consuelo de Jesús, González-Hernandez Juan Carlos. (2021). Morphology about the varieties mexican pomegranate fruit (*Punica granatum*) and its ripening stage. *Food Science and Technology*, 41, 993-999. <https://doi.org/10.1590/fst.28620>
- Corripio, R., Selene, L., Ramírez-Corona, N., López-Malo, A., & Palou, E. (2017). Effect of short wave ultraviolet radiation on selected properties of edible films formulated with pomegranate juice and chitosan. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 17, 63-73.
- Dahiya, M., Saha, S., & Shahiwala, F. A. (2009). A Review on Mouth Dissolving Films. *Current Drug Delivery*, 6(5), 469-476. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2174/156720109789941713>
- 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/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.014>
- Ejjilani, A., Houmanat, K., Hanine, H., Hssaini, L., Elfazazi, K., Hernandez, F., . . . Razouk, R. (2022). Pomegranate morpho-chemodiversity: computational investigations based on in-vivo and in-vitro screening. *Heliyon*, 8(5), e09345. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09345>

- El Kar, C., Ferchichi, A., Attia, F., & Bouajila, J. (2011). Pomegranate (*Punica granatum*) juices: chemical composition, micronutrient cations, and antioxidant capacity. *J Food Sci*, 76(6), C795-800. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02211.x>
- Espino-Manzano, S. O., León-López, A., Aguirre-Álvarez, G., González-Lemus, U., Prince, L., & Campos-Montiel, R. G. (2020). Application of Nanoemulsions (W/O) of Extract of *Opuntia oligacantha* C.F. Först and Orange Oil in Gelatine Films. *Molecules* (Basel, Switzerland), 25(15). <https://doi.org/10.3390/molecules25153487>
- Fai, A. E. C., Alves de Souza, M. R., de Barros, S. T., Bruno, N. V., Ferreira, M. S. L., & Gonçalves, É. C. B. d. A. (2016). Development and evaluation of biodegradable films and coatings obtained from fruit and vegetable residues applied to fresh-cut carrot (*Daucus carota* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 112, 194-204. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.021>
- Favaro, L. I. L., Balcão, V. M., Rocha, L. K. H., Silva, E. C., Oliveira Jr, J. M., Vila, M. M. D. C., & Tubino, M. (2018). Physicochemical Characterization of a Crude Anthocyanin Extract from the Fruits of *Jussara* (*Euterpe edulis* Martius): Potential for Food and Pharmaceutical Applications. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29.
- Fawole, O. A., Opara, U. L., & Theron, K. I. (2012). Chemical and Phytochemical Properties and Antioxidant Activities of Three Pomegranate Cultivars Grown in South Africa. *Food and Bioprocess Technology*, 5(7), 2934-2940. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0533-7>
- Fernandes, L., Pereira, J. A., López-Cortés, I., Salazar, D. M., González-Álvarez, J., & Ramalhosa, E. (2017). Physicochemical composition and antioxidant activity of several pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars grown in Spain. *European Food Research and Technology*, 243(10), 1799-1814. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2884-4>
- Fernández Valdés, D., Bautista Baños, S., Fernández Valdés, D., Ocampo Ramírez, A., García Pereira, A., & Falcón Rodríguez, A. (2015). Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, 24, 52-57. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542015000300008&nrm=iso
- Ferrazzano, G. F., Scioscia, E., Sateriale, D., Pastore, G., Colicchio, R., Pagliuca, C., . . . Pagliarulo, C. (2017). In Vitro Antibacterial Activity of Pomegranate Juice and Peel Extracts on Cariogenic Bacteria. *BioMed research international*, 2017, 2152749-2152749. <https://doi.org/10.1155/2017/2152749>

- Fialová, S., Tekel'ová, D., Rendeková, K., Klinčok, J., Kolárik, M., Kurucová, K., & Grančai, D. (2015). Phenolic compounds variation in *Mentha L.* Species in the course of a four-years period / Kolísanie fenolových látok v rôznych druhoch *Mentha L.* Počas 4 ročného obdobia. *European Pharmaceutical Journal*, 62(s9), 2-7. <https://doi.org/doi:10.1515/afpuc-2015-0013>
- Ghodake, P., Karande, K., Osmani, R., Bhosale, R., Harkare, B., & Kale, B. (2013). Mouth Dissolving Films: Innovative Vehicle for Oral Drug Delivery. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2, 41-47.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant Activity of Pomegranate Juice and Its Relationship with Phenolic Composition and Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>
- Giusti, M. M., & Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E., & Montero, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813-1827. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.02.007>
- Gözlekçi, S., Saraçoğlu, O., Onursal, E., & Ozgen, M. (2011). Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extracts of four pomegranate cultivars. *Pharmacogn Mag*, 7(26), 161-164. <https://doi.org/10.4103/0973-1296.80681>
- Hanani, Z. A. N., Yee, F. C., & Nor-Khaizura, M. A. R. (2019). Effect of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging. *Food Hydrocolloids*, 89, 253-259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.007>
- Himani, Kumar, N., Prabhakar, P. K., & Pant, V. (2021). Physical, Mechanical, Functional, and Thermal Characterization of Chitosan: Maltodextrin Blends Edible Oral Film Incorporated with Aqueous Clove Extract. *Starch - Stärke*, 73(1-2), 1900220. <https://doi.org/doi.org/10.1002/star.201900220>
- Himani, Singla, M., Prabhakar, P. K., Sharma, A., & Meghwal, M. (2022). Edible and Oral Thin Films: Formulation, Properties, Functions, and Application in Food Packaging and Pharmaceutical Industry. In A. Poonia & T. Dhewa (Eds.), *Edible Food Packaging : Applications, Innovations and Sustainability* (pp. 411-432). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-16-2383-7_21
- Hmid, I., Elothmani, D., Hanine, H., Oukabli, A., & Mehinagic, E. (2017). Comparative study of phenolic compounds and their antioxidant attributes of eighteen pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars grown in Morocco. *Arabian Journal*

- of *Chemistry*, 10, S2675-S2684.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.10.011>
- Hofman, D. L., van Buul, V. J., & Brouns, F. J. (2016). Nutrition, Health, and Regulatory Aspects of Digestible Maltodextrins. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 56(12), 2091-2100.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2014.940415>
- Holland, D., Hatib, K., & Bar-Ya'akov, I. (2009). Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. In J. Janick (Ed.), *Horticultural Reviews* (Vol. 35, pp. 127-191). John Wiley & Sons. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780470593776.ch2>
- Irfan, M., Rabel, S., Bukhtar, Q., Qadir, M. I., Jabeen, F., & Khan, A. (2016). Orally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24(5), 537-546.
<https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jsps.2015.02.024>
- Jain, A., Ahirwar, H. T., S. , & Mohanty, P. (2018). FAST DISSOLVING ORAL FILMS: A TABULAR UPDATE. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(4), 10-19.
<https://doi.org/10.22270/jddt.v8i4.1724>
- Jamróz, E., & Kopel, P. (2020). Polysaccharide and Protein Films with Antimicrobial/Antioxidant Activity in the Food Industry: A Review. *Polymers*, 12(6), 1289. <https://doi.org/10.3390/polym12061289>
- Jovanović, M., Tomić, N., Cvijić, S., Stojanović, D., Ibrić, S., & Uskoković, P. (2021). Mucoadhesive Gelatin Buccal Films with Propranolol Hydrochloride: Evaluation of Mechanical, Mucoadhesive, and Biopharmaceutical Properties. *Pharmaceutics*, 13(2), 273. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020273>
- Kalyan, S., & Bansal, M. (2012). Recent Trends in the Development of Oral dissolving Film. *PharmTech*, 4(2), 725-733.
- Kandylis, P., & Kokkinomagoulos, E. (2020). Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. *Foods*, 9(2).
<https://doi.org/10.3390/foods9020122>
- Kandylis, P., & Kokkinomagoulos, E. (2020). Food Applications and Potential Health Benefits of Pomegranate and its Derivatives. *Foods*, 9(2), 122.
<https://www.mdpi.com/2304-8158/9/2/122>
- Kaoutar, E., Loubna, C., el Kettabi, Z., Noutfia, Y., Charafi, J., & Fakhour, S. (2022). Quality attributes, chemical properties, and selected bioactive compounds of pomegranate juice (*Punica granatum* L.) processed from arils after freezing storage. 236-255. <https://doi.org/10.34874/IMIST.PRSM/afirmed-i134.31679>
- Karki, S., Kim, H., Na, S.-J., Shin, D., Jo, K., & Lee, J. (2016). Thin films as an emerging platform for drug delivery. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11(5), 559-574. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.ajps.2016.05.004>

- Khairnar, A., Jain, P., Baviskar, D., & Jain, D. (2009). Development of mucoadhesive buccal patch containing aceclofenac: In vitro evaluations. *International Journal of PharmTech Research*, 1, 974.
- Khaksar, G., Assatarakul, K., & Sirikantaramas, S. (2019). Effect of cold-pressed and normal centrifugal juicing on quality attributes of fresh juices: do cold-pressed juices harbor a superior nutritional quality and antioxidant capacity? *Heliyon*, 5(6), e01917. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01917>
- Kishore, D., Kundu, S., & Kayastha, A. M. (2012). Thermal, chemical and pH induced denaturation of a multimeric β -galactosidase reveals multiple unfolding pathways. *PLoS One*, 7(11), e50380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050380>
- Kommareddy, S., Shenoy, D. B., & Amiji, M. M. (2007). Gelatin Nanoparticles and Their Biofunctionalization. In C. S. S. R. Kumar (Ed.), *Nanotechnologies for the Life Sciences* (Vol. 1, pp. 330-352). Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527610419.ntls0011>
- Kumar, N., Neeraj, Ojha, A., & Singh, R. (2019). Preparation and characterization of chitosan - pullulan blended edible films enriched with pomegranate peel extract. *Reactive and Functional Polymers*, 144, 104350. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104350>
- Kumar, N., Pratibha, Trajkovska Petkoska, A., Khojah, E., Sami, R., & Al-Mushhin, A. A. M. (2021). Chitosan Edible Films Enhanced with Pomegranate Peel Extract: Study on Physical, Biological, Thermal, and Barrier Properties. *Materials (Basel)*, 14(12). <https://doi.org/10.3390/ma14123305>
- Labbe, M., Ulloa, P. A., Lopez, F., Saenz, C., Pena, A., & Salazar, F. N. (2016). Characterization of chemical compositions and bioactive compounds in juices from pomegranates ('Wonderful', 'Chaca', and 'Codpa') at different maturity stages. *Chilean journal of agricultural research*, 76, 479-486. http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-58392016000400012&nrm=iso
- Lim, L. M., & Hadinoto, K. (2021). High-Payload Buccal Delivery System of Amorphous Curcumin-Chitosan Nanoparticle Complex in Hydroxypropyl Methylcellulose and Starch Films. *International journal of molecular sciences*, 22(17). <https://doi.org/10.3390/ijms22179399>
- Liu, T., Wang, J., Chi, F., Tan, Z., & Liu, L. (2020). Development and Characterization of Novel Active Chitosan Films Containing Fennel and Peppermint Essential Oils. *Coatings*, 10(10).
- Longtin, R. (2003). The Pomegranate: Nature's Power Fruit? *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 95(5), 346-348. <https://doi.org/10.1093/jnci/95.5.346>

- Low, A., Kok, S. L., Khong, Y. M., Chan, S. Y., & Gokhale, R. (2015). A New Test Unit for Disintegration End-Point Determination of Orodispersible Films. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(11), 3893-3903. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jps.24609>
- Mabrouk, O., Shaltout, O., Amin, W., Ezz, T., Zeitoun, A., El-Sayed, O., . . . Mohamed, Z. (2019). Evaluation of Bioactive Compounds in Pomegranate Fruit Parts as an Attempt for Their Application as an Active Edible Film. *Journal of Biomaterials*, 3, 7-17. <https://doi.org/10.11648/j.jb.20190301.12>
- Matwijczuk, A., Budziak-Wieczorek, I., Czernel, G., Karcz, D., Barańska, A., Jedlińska, A., & Samborska, K. (2022). Classification of Honey Powder Composition by FTIR Spectroscopy Coupled with Chemometric Analysis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(12).
- Melgarejo-Sánchez, P., Núñez-Gómez, D., Martínez-Nicolás, J. J., Hernández, F., Legua, P., & Melgarejo, P. (2021). Pomegranate variety and pomegranate plant part, relevance from bioactive point of view: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00351-5>
- Nagar, P., Chauhan, I., & Yasir, M. (2011). Insights into Polymers: Film Formers in Mouth Dissolving Films. *Drug invention today*, 3(12).
- Nair, A. B., Kumria, R., Harsha, S., Attimarad, M., Al-Dhubiab, B. E., & Alhaider, I. A. (2013). In vitro techniques to evaluate buccal films. *Journal of Controlled Release*, 166(1), 10-21. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.11.019>
- Nasseripour, M., Newton, J. T., Warburton, F., Awojobi, O., Di Giorgio, S., Gallagher, J. E., & Banerjee, A. (2022). A Systematic Review and Meta-Analysis of the Role of Sugar-Free Chewing Gum on Plaque Quantity in the Oral Cavity [Systematic Review]. *Frontiers in Oral Health*, 3. <https://doi.org/10.3389/froh.2022.845921>
- O'Grady, L., Sigge, G., Caleb, O. J., & Opara, U. L. (2014). Bioactive compounds and quality attributes of pomegranate arils (*Punica granatum* L.) processed after long-term storage. *Food Packaging and Shelf Life*, 2(1), 30-37. <https://doi.org/doi.org/10.1016/j.fpsl.2014.06.001>
- Otálora González, C. M., Schelegueda, L. I., Pizones Ruiz-Henestrosa, V. M., Campos, C. A., Basanta, M. F., & Gerschenson, L. N. (2022). Cassava Starch Films with Anthocyanins and Betalains from Agroindustrial by-Products: Their Use for Intelligent Label Development. *Foods*, 11(21).
- Panraksa, P., Tipduangta, P., Jantanasakulwong, K., & Jantrawut, P. (2020). Formulation of Orally Disintegrating Films as an Amorphous Solid Solution of a Poorly Water-Soluble Drug. *Membranes*, 10(12), 376. <https://www.mdpi.com/2077-0375/10/12/376>

- Pimparade, M. B., Vo, A., Maurya, A. S., Bae, J., Morott, J. T., Feng, X., . . . Repka, M. A. (2017). Development and evaluation of an oral fast disintegrating anti-allergic film using hot-melt extrusion technology. *Eur J Pharm Biopharm*, 119, 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.06.004>
- Pirzadeh, M., Caporaso, N., Rauf, A., Shariati, M. A., Yessimbekov, Z., Khan, M. U., . . . Mubarak, M. S. (2021). Pomegranate as a source of bioactive constituents: a review on their characterization, properties and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 61(6), 982-999. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1749825>
- Prajapati, V. D., Chaudhari, A. M., Gandhi, A. K., & Maheriya, P. (2018). Pullulan based oral thin film formulation of zolmitriptan: Development and optimization using factorial design. *Int J Biol Macromol*, 107(Pt B), 2075-2085. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.082>
- Prasad, D., & Kunnaiah, R. (2014). Punica granatum: A review on its potential role in treating periodontal disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 18(4), 428-432. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.138678>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9), 1231-1237. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Rodríguez, G. M., Sibaja, J. C., Espitia, P. J. P., & Otoni, C. G. (2020). Antioxidant active packaging based on papaya edible films incorporated with Moringa oleifera and ascorbic acid for food preservation. *Food Hydrocolloids*, 103, 105630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.105630>
- Saini, P., Kumar, A., Sharma, P., & Visht, S. (2012). Fast Disintegrating Oral Films: A Recent Trend of Drug Delivery. *International Journal of Drug Development and Research*, 4, 80-94.
- Schrieber, R., & Gareis, H. (2007). From Collagen to Gelatin. In *Gelatin Handbook. Theory and Industrial Practice* (pp. 45-117). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9783527610969.fmatter>
- Sevinç Özakar, R., & Özakar, E. (2021). Current Overview of Oral Thin Films. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 18(1), 111-121. <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2020.76390>
- Shaikh, S., Yaqoob, M., & Aggarwal, P. (2021). An overview of biodegradable packaging in food industry. *Current research in food science*, 4, 503-520. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.07.005>
- Sharma, D., Kaur, D., Verma, S., Singh, D., Singh, M., Singh, G., & Garg, R. (2015). Fast Dissolving Oral Films Technology: A Recent Trend For An Innovative Oral Drug Delivery System. *International Journal of Drug Delivery*, 7, 60-75.

- SIAP. (2020). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola*. nube.siap.gob.mx/cierreagricola/
- Siddiqui, M., Garg, G., & Sharma, P. (2010). A Short Review on "A Novel Approach in Oral Fast Dissolving Drug Delivery System and Their Patents". *Adv Biol Res*, 5.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in Enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic Press. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Speer, I., Steiner, D., Thabet, Y., Breikreutz, J., & Kwade, A. (2018). Comparative study on disintegration methods for oral film preparations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 132, 50-61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.09.005>
- Taylan, O., Cebi, N., & Sagdic, O. (2021). Rapid Screening of Mentha spicata Essential Oil and L-Menthol in Mentha piperita Essential Oil by ATR-FTIR Spectroscopy Coupled with Multivariate Analyses. *Foods*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/foods10020202>
- Tian, Y., Lin, J., Jing, H., Wang, Q., Wu, Z., & Duan, Y. (2023). Recent progress in orodispersible films-mediated therapeutic applications: A review. *MedComm – Biomaterials and Applications*, 2(2), e34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mba2.34>
- Uzuner, S. (2020). Pomegranate. In A. K. Jaiswal (Ed.), *Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables* (pp. 549-563). Academic Press. <https://doi.org/doi.org/10.1016/B978-0-12-812780-3.00034-9>
- Visser, J. C., Eugresya, G., Hinrichs, W. L. J., Tjandrawinata, R. R., Avanti, C., Frijlink, H. W., & Woerdenbag, H. J. (2017). Development of orodispersible films with selected Indonesian medicinal plant extracts. *Journal of Herbal Medicine*, 7, 37-46. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hermed.2016.10.002>
- Ward, & Cheryl. (2003). Pomegranates in eastern Mediterranean contexts during the Late Bronze Age. *World Archaeology*, 34(3), 529-541. <https://doi.org/10.1080/0043824021000026495>
- Wu, Z., Tan, B., Liu, Y., Dunn, J., Martorell Guerola, P., Tortajada, M., . . . Ji, P. (2019). Chemical Composition and Antioxidant Properties of Essential Oils from Peppermint, Native Spearmint and Scotch Spearmint. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 2825. <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/15/2825>
- Xu, G., Reci, M., Blackwell, B. L., Robinson, R. S., Viscio, D. B., & Curtis, J. P. (2002). *Breath freshening film* (New York, US. Patent No. 6419903B1). uspto. <https://patents.google.com/patent/US6419903B1/en?q=US+6%2c419%2c903+B1+>

- Zhang, M., Zhang, T., Zou, Y., Han, P., & Liu, K. (2019). Self-microemulsifying oral fast dissolving films of vitamin D3 for infants: Preparation and characterization. *Food Science & Nutrition*, 7(8), 2577-2583. <https://doi.org/doi.org/10.1002/fsn3.1108>
- Zhang, Y., Liu, Q., & Rempel, C. (2018). Processing and characteristics of canola protein-based biodegradable packaging: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 58(3), 475-485. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1193463>
