

**Trabajo Científico**

# **Formulación y evaluación de un parche bucal compuesto de propóleo y *Echinacea purpurea***

## **Formulation and evaluation of a buccal patch composed of propolis and *Echinacea purpurea***

Leticia Cruz-Antonio,<sup>1</sup> María Elena Sánchez-Mendoza,<sup>2</sup> Elena Guillén,<sup>1</sup> María de los Ángeles Vidal,<sup>1</sup> Jesús Arrieta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM

<sup>2</sup>Escuela Superior de Medicina, IPN

---

### **Resumen**

Los parches bucales que liberan al fármaco en la cavidad oral a una velocidad predeterminada, pueden presentar ventajas sobre formas farmacéuticas tradicionales, como tabletas, geles y soluciones. En odontología se han realizado investigaciones que involucran al propóleo, debido a sus propiedades antimicrobianas, anti-inflamatorias y analgésicas. Considerando, que *Echinacea purpurea* tiene las mismas propiedades que el propóleo y puede ser combinado con éste, en el presente estudio se desarrollaron formulaciones de parches bucales conteniendo *Echinacea* (tintura) y propóleo (extracto etanólico). A las diferentes formulaciones, se les determinaron sus propiedades organolépticas, fisicoquímicas y características de liberación. De doce formulaciones evaluadas, cinco mostraron las mejores propiedades necesarias para soportar el ambiente de la cavidad oral; y solo una de éstas (formulación 4) mostró la liberación de los extractos acorde a una formulación de parche bucal.

---

### **Abstract**

A buccal patch, which releases the drug in the oral cavity at predetermined rate, may present advantages over traditional dosage forms, such as tablets, gels and solutions. Current research in dentistry regarding propolis spans many fields and highlights its antimicrobial, anti-inflammatory and analgesic activities. Considering that *Echinacea* has the same properties as propolis, the aim of the present study was to develop formulations of twelve buccal patches containing *Echinacea purpurea* and propolis in tincture and ethanolic extract, respectively. These patches were evaluated for their organoleptic, physicochemical and release characteristics. Of the twelve formulations evaluated, five showed the best properties required to withstand the environment of the oral cavity, and only one of them (formulation 4) released the active ingredients in a form adequate for its use as a buccal patch.

---

**Palabras clave:** parche mucoadhesivo, odontología, cavidad oral, formulación de extractos.

**Key words:** mucoadhesive patch, dentistry, oral cavity, formulations of extracts.

---

### **Correspondencia**

Jesús Arrieta Valencia,  
Escuela Superior de Medicina,  
Instituto Politécnico Nacional,  
Plan de San Luis y Díaz Mirón,  
Colonia Santo Tomás,  
Delegación Miguel Hidalgo  
11340, México D.F., México.  
E-mail: jearrval@yahoo.com.mx

Fecha de recepción: 4 de julio de 2011

Fecha de recepción de modificación: 24 de agosto de 2011

Fecha de aceptación: 4 de noviembre de 2011

## Introducción

La liberación de los fármacos en la cavidad oral provee una alternativa atractiva para la administración de los fármacos vía oral.<sup>1</sup> La vía bucal tiene una amplia aceptación debido a que evita el metabolismo del primer paso además la posibilita para la liberación de los fármacos de forma controlada. Un parche bucal adecuado debe ser flexible y poseer buenas propiedades mucoadhesivas para que pueda ser retenido en la cavidad oral para una adecuada duración. En consecuencia, la evaluación de las propiedades mecánicas, mucoadhesivas y de hinchamiento en los parches bucales son críticas.<sup>2</sup>

El propóleo es una mezcla de cera de abejas, resina vegetal, bálsamo vegetal, aceites aromáticos esenciales y polen entre otras sustancias.<sup>3</sup> Es ampliamente utilizado en la medicina tradicional y en la industria biocosmética. Puede ser encontrado en tabletas, polvos, lociones, ungüentos, soluciones, cremas, pastas dentales, goma de mascar, etc.<sup>4</sup>

Se ha demostrado que el propóleo tiene propiedades antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatorias, antitumorales e inmunomoduladoras.<sup>5-7</sup> En años recientes se han incrementado los estudios sobre sus aplicaciones debido al conocimiento de sus propiedades terapéuticas y biológicas.<sup>8,9</sup> Investigaciones actuales involucran al propóleo en el campo de la odontología particularmente en cariología, cirugía oral, periodontitis, endodontitis, gingivitis, aftas y caries dentales debido a sus propiedades anti-inflamatorias y anti-microbianas.<sup>8-12</sup>

Al igual que el propóleo, *Echinacea purpurea* es utilizada en la medicina tradicional en diferentes formas farmacéuticas.<sup>13</sup> Existen diversos estudios *in vitro* e *in vivo* sobre las actividades farmacológicas de varias especies de *Echinacea*. Algunas de estas investigaciones se han enfocado a su actividad inmunomoduladora, anti-viral, anti-fúngica, anti-bacteriana, analgésica, anti-inflamatoria y anti-oxidante entre otras.<sup>13-15</sup> Considerando que propóleo y *Echinacea* actúan como, anti-inflamatorios y anti-bacterianos además de que pueden ser combinados, en el presente estudio se desarrollaron parches bucales que contienen ambos constituyentes con una posible aplicación en el ámbito odontológico.

## Material y método

El extracto etanólico de propóleo y la tintura de *Echinacea purpurea* fueron adquiridos de Mixim México y de Bioextracto México, respectivamente. Eudragit NE 30D (Poli(etyl acrilato-co-metil metacrilato)) se obtuvo de Röhm Pharma, U.S.A. Croscarmelosa de sodio, polivinilpirrolidona, PEG 400 (Polietilenglicol), manitol, anís, menta y miristato de isopropilo fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, USA.

### Preparación de los parches

Polivinilpirrolidona o Eudragit NE 30D y croscarmelosa de sodio fueron disueltos en una mezcla de etanol/agua (5:1). Posteriormente se adicionó PEG 400 y miristato de isopropilo (1%) previamente disueltos. La solución fue mezclada por 15 min con el objeto de remover las burbujas. De forma inmediata se adicionaron 3 mL de etanol, seguido por el extracto etanólico de propóleo (5%) y tintura de *Echinacea purpurea* (15%), ambos disueltos en 2.5 mL de etanol. Finalmente, 2.2 mL de edulcorante (manitol 2%) y saborizante (menta 0.75% ó anís 0.75%) fueron adicionados, previamente disueltos en 0.5 mL de etanol. La capa polimérica obtenida fue colocada en un papel polypap® (10 x 5 x 1.5 cm), y secada a temperatura ambiente por 24 h, lo anterior con el objeto de remover los solventes residuales. La composición de las diferentes formulaciones desarrolladas con base en los estudios de preformulación se muestran en la Tabla 1.

### Evaluación de los parches

#### Apariencia y sabor

La homogeneidad de la superficie de los parches considerando los aspectos de: color, integridad y libre de burbujas, fueron evaluados mediante observaciones visuales. La prueba de sabor, se determinó por un método organoléptico, considerando la respuesta de 20 voluntarios.<sup>16</sup> Los criterios de exclusión fueron la presencia de imperfecciones, aire atrapado y/o sabor desagradable.

#### Variación de peso

El peso de 10 (2 x 2 x 0.5 cm) parches fue determinado y con ello se calculó el promedio y la desviación estándar.

#### Resistencia al doblamiento

La resistencia al doblamiento se determinó al doblar a los parches repetidas veces, en el mismo lugar, contando el número de veces sin romperse o hasta 100 veces, lo que ocurriera primero.<sup>17</sup>

#### Medida de hinchamiento

El hinchamiento de las capas poliméricas fue determinada mediante la colocación de las películas en 5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos a pH de 6.8. La relación de hinchamiento se midió después del contacto de la película con la solución amortiguadora por 50 seg con un intervalo de 3 min entre cada determinación a temperatura ambiente. En cada intervalo predeterminado de tiempo, los residuos de la solución amortiguadora fueron eliminados y de forma inmediata se determinó el peso de la película hinchada. La relación del hinchamiento fue calculada utilizando la siguiente fórmula  $[(W_p - W_s)/W_s] \times 100$ , donde  $W_s$  y  $W_p$  son el peso de la película seca antes de la prueba y el peso de la película después de la prueba, respectivamente.<sup>18</sup>

### pH de la superficie

En una caja Petri, con 0.7 mL de una solución amortiguadora (pH 6.8), los parches fueron colocados por 2 min, de forma inmediata se determinó el pH de la superficie de los parches utilizando papel pH (pHIX indicators strips, pH range of 6.0 to 7.7, JT Baker, USA). El registro de los valores fue la media de tres determinaciones.

### Viscosidad

Una solución acuosa que contenía tanto al polímero como el plastificante fue preparada en la misma concentración que la de los parches. Un viscosímetro (model LVT-Brookfield, Canadá) con una aguja LV número 4, fue usado para la determinación de la viscosidad a 30 rpm y a temperatura ambiente. El registro de los valores fue la media de tres determinaciones.

### Adhesividad

La bioadhesividad de los parches bucales fue determinada usando TA.XT2 Texture Analyser (Stable Micro Systems, Haslemere, UK). El buche del pollo fue usado como modelo para estudiar la bioadhesión a los tejidos, siguiendo el método de Wong,<sup>19</sup> con modificaciones en la escala de medición. Los criterios para adhesividad fueron nula (0-1 N/cm<sup>2</sup>), moderada (2-3 N/cm<sup>2</sup>) y apropiada (4-5 N/cm<sup>2</sup>).

### Estudios de liberación *in vitro*

La liberación de los extractos de propóleo y de *Echinacea purpurea* de los parches bucales fue estudiada utilizando una versión modificada de las celdas de Franz.<sup>20</sup> Parches de 2 cm<sup>3</sup> (2 x 2 x 0.5 cm) fueron colocados desde el fondo hasta la parte alta de la celda de Franz. Se utilizaron 125 mL de solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8) como medio de disolución. La velocidad de agitación fue de 150 rpm y la temperatura se mantuvo a 37 ± 0.5°C. Muestras de 3 mL fueron tomadas de las celdas y el mismo volumen de medio a la temperatura mencionada fue remplazado con la finalidad de mantener un volumen constante. Cada muestra fue analizada espectrofotométricamente a 211 y 254 nm para propóleo y *Echinacea* respectivamente, los tiempos de muestreo fueron los siguientes: 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 y 60 minutos, el estudio fue realizado por triplicado. El método espectrofotométrico fue seleccionado debido a que tanto propóleo como *Echinacea* contienen compuestos cromóforos.<sup>21,22</sup> El método analítico fue previamente validado, siguiendo las recomendaciones de la guía ICH.<sup>23</sup>

### Uniformidad de contenido

Los parches bucales se disolvieron en 100 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (pH 6.8), la solución resultante se colocó en un baño de ultrasonido por 2 min. La presencia de los extractos de propóleo y *Echinacea* fue determinada

espectrofotométricamente a 211 y 254 nm, respectivamente. El contenido de cada parche fue determinado por comparación de las absorbancias obtenidas de las soluciones de referencia de los extractos preparadas concomitantemente.

## Resultados y discusión

Nueve de las doce formulaciones de los parches fueron preparadas utilizando polivinilpirrolidona como polímero (Tabla 1), siendo estas la que mejores características organolépticas y físicas mostraron, en comparación con aquellas formulaciones donde se utilizó a eudragit NE 30D como polímero. Las formulaciones realizadas con eudragit NE 30D resultaron con una coloración más oscura, presentaron formación de grumos y burbujas, por lo que se consideró que su aspecto era desagradable. Por el contrario las formulaciones efectuadas con polivinilpirrolidona presentaron una mejor apariencia, sabor, color y adhesividad. De acuerdo a los resultados presentados en la Tabla 2 las formulaciones con las mejores características organolépticas y físicas fueron: 4, 5, 7, 10 y 12.

**Tabla 1. Ingredientes de las formulaciones de los parches mucoadhesivos con propóleo y**

Formulación	Polímero %			Plastificante %	Extracto %		E dulcorante %	Saborizante %		Mejorador de absorción %			
	A	Formador de película			A	B		A	B				
		B	C										
1	34	17	---	24.5	5	15	2	0.75	0.75	1			
2	30	15	---	30.5	5	15	2	0.75	0.75	1			
3	38	20	---	17.5	5	15	2	0.75	0.75	1			
4	30	---	30	15.5	5	15	2	0.75	0.75	1			
5	35	---	23	17.5	5	15	2	0.75	0.75	1			
6	25	---	20	30.5	5	15	2	0.75	0.75	1			
7	40	---	15.5	20	5	15	2	0.75	0.75	1			
8	40	---	12.5	23	5	15	2	0.75	0.75	1			
9	35	---	15.5	25	5	15	2	0.75	0.75	1			
10	35	---	17.5	23	5	15	2	0.75	0.75	1			
11	30	---	17.5	28	5	15	2	0.75	0.75	1			
12	30	---	20.5	25	5	15	2	0.75	0.75	1			

Polímero: A = croscarmelosa de sodio; formador de película B = Eudragit NE 30D, C = Polivinilpirrolidona; plastificante = polietilenglicol (400); extracto: A = propóleo, B = *Echinacea*; edulcorante = manitol; saborizante: A = mentol, B = anís; mejorador = miristato de isopropiolo.

**Tabla 2. Evaluación de los parches con respecto a: apariencia, sabor, color y adhesividad**

Formulación	Apariencia	Sabor	Color	Adhesividad
1	Heterogénea, con burbujas y opaca	Agradable	Agradable	Moderada
2	Heterogénea, con burbujas y opaca	Ligeramente desagradable	Ligeramente Desagradable	Moderada
3	Heterogénea, con burbujas y opaca	Agradable	Desagradable	Moderada
4	Apropiada	Agradable	Agradable	Apropiada
5	Apropiada	Agradable	Agradable	Apropiada
6	Homogénea, con burbujas, opaca y blanca	Agradable	Agradable	Apropiada
7	Apropiada	Agradable	Agradable	Apropiada
8	Homogénea, con burbujas	Agradable	Ligeramente desagradable	Apropiada
9	Homogénea, con burbujas, opaca y blanca	Agradable	Desagradable	Apropiada
10	Apropiada	Agradable	Agradable	Apropiada
11	Homogénea, con burbujas y opaca	Ligeramente desagradable	Agradable	Apropiada
12	Apropiada	Agradable	Agradable	Apropiada

Las evaluaciones se realizaron por triplicado excepto sabor (n = 20)

De las formulaciones seleccionadas, la variación de peso de los parches bucales osciló entre 0.926 y 0.993 g. La resistencia al doblamiento estuvo en un rango de 42 a 83 veces (Tabla 3) adecuado para una formulación de parche y atribuida al contenido de polivinilpirrolidona en las formulaciones, la cual proporcionó a éstas una alta resistencia mecánica y buena elasticidad. Es importante conocer este valor, debido a que la resistencia al doblamiento es una medida de la fuerza para soportar los movimientos causados por la boca cuando el paciente tiene que hablar, reír y comer.<sup>17</sup> El pH de la superficie de todas las formulaciones se encontró dentro del rango deseable (pH neutro), valor que sugiere que el parche no provocará irritación a la mucosa (Tabla 4).

La determinación del hinchamiento es otra de las determinaciones importantes, dado que es indicativa de la velocidad de penetración de la sustancia de interés en el sitio de administración y de la debilidad de las cadenas poliméricas en la formulación, una vez que están en contacto directo con el fluido bucal.<sup>24</sup> En el caso de los parches bucales, el área de contacto debe ser lo suficientemente grande para satisfacer la exigencia de cambios en las cadenas poliméricas aunque no demasiado para no incomodar al paciente, ya que un incremento excesivo en el área del parche podría causar malestar y/o desplazamiento del parche.<sup>17</sup> Las mediciones de los valores de hinchamiento se obtuvieron en un rango de 91.43 a 97.77% (Tabla 3). Para las formulaciones 4 y 5, el porcentaje obtenido fue casi del 95%, lo que probablemente indica que la penetración de las moléculas de las sustancias de interés es favorecida de manera importante por puentes de hidrógeno, entre estas y el polímero, lo que llevará a una mayor difusión de las sustancias, en las formulaciones con un valor de hinchamiento por encima del 95%, como lo indica Chun et al., 2003.<sup>18</sup>

Las formulaciones 4 y 5 presentaron una viscosidad similar, la cual fue más baja que las obtenidas para las otras formulaciones (Tabla 4). Debido que la bioadhesión comienza con la difusión de las cadenas poliméricas en la región interfacial es importante que las cadenas poliméricas contengan un grado sustancial de flexibilidad a fin de lograr la adhesión deseada con las mucosas. En general, la movilidad, y la flexibilidad de los polímeros pueden estar relacionadas con su viscosidad y los coeficientes de difusión, donde una mayor flexibilidad causa mayor difusión en el moco.<sup>25</sup> Aunque las formulaciones 4 y 5 no tienen la mayor viscosidad y flexibilidad (Tablas 3 y 4) en comparación con otras formulaciones, sus valores de viscosidad y de flexibilidad fueron suficientes para obtener una adhesividad (Tabla 2) y una uniformidad de contenido adecuados. El porcentaje de uniformidad de contenido en los parches fueron de  $97.61 \pm 3.05\%$  y  $103.71 \pm 2.41\%$  para el propóleo y *Echinacea* respectivamente.

**Tabla 3. Pruebas para los parches bucales con las mejores características físicas**

Formulación	Variación de peso (g) n = 10	Resistencia al doblamiento n = 6	Medida de hinchamiento (%) n = 6
4	$0.993 \pm 0.022$	$56 \pm 0.65$	$95.45 \pm 1.65$
5	$0.926 \pm 0.007$	$53 \pm 0.87$	$94.87 \pm 1.47$
7	$0.963 \pm 0.015$	$83 \pm 0.672$	$96.35 \pm 1.25$
10	$0.937 \pm 0.014$	$62 \pm 0.89$	$97.77 \pm 0.97$
12	$0.974 \pm 0.046$	$42 \pm 0.67$	$91.43 \pm 1.87$

Los valores representan el promedio  $\pm$  la DE

**Tabla 4. Determinación del pH y viscosidad de los parches bucales**

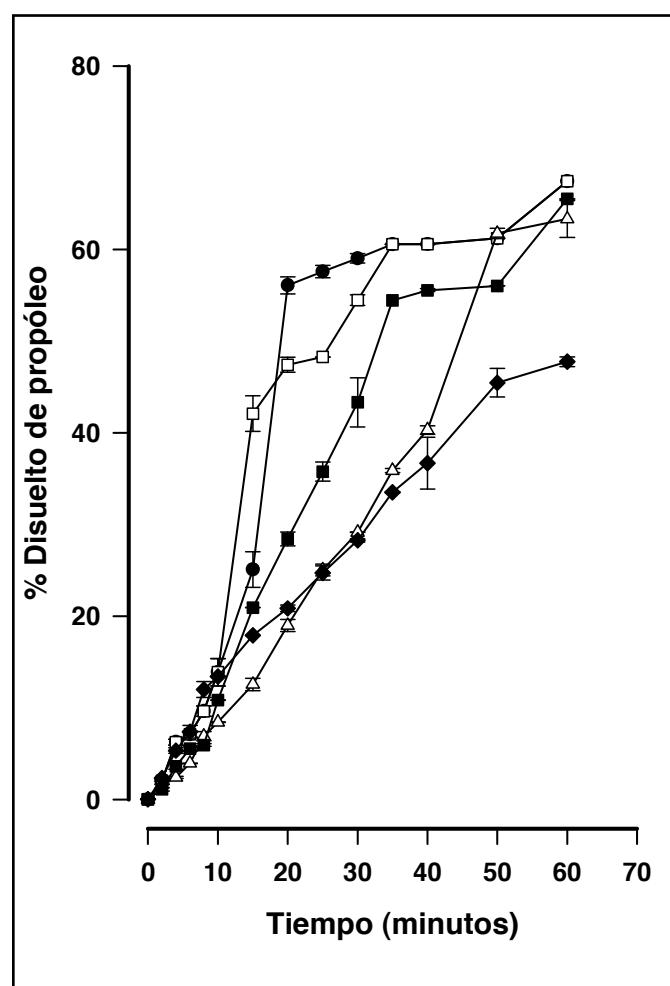
Formulación	pH n = 3	Viscosidad (cpoises) n = 3
4	7.0 ± 0.1	2700 ± 90.67
5	6.9 ± 0.2	2700 ± 91.73
7	7.1 ± 0.1	3100 ± 92.97
10	7.0 ± 0.1	3300 ± 102.01
12	6.8 ± 0.2	3800 ± 95.67

Los perfiles de disolución *in vitro* de los parches de propóleo y *Echinacea*, efectuados con las formulaciones 4, 5, 7, 10 y 12 se presentan en las Figuras 1 y 2, donde se puede observar que la liberación de los constituyentes comenzó alrededor de los 2 minutos y se prolongó hasta 60 minutos, en mayor o menor magnitud dependiendo de la formulación. Estas respuestas indican que las formulaciones propuestas presentan una liberación inmediata, permitiendo de esta forma la posible absorción de los componentes de propóleo y *Echinacea* a dosis adecuadas.

La liberación de *Echinacea* (Figura 2) comenzó a los 2 minutos en todas las formulaciones y continuó hasta los 50 minutos, después de ese tiempo hubo una variación mayor de acuerdo a la formulación. Las formulaciones 5 y 12 presentaron la menor liberación del extracto en los primeros 10 minutos, (14 y 21%, respectivamente), en tanto para las formulaciones 4, 7 y 10 fueron de 47, 34 y 28%, respectivamente. Estos resultados indican que el mejor perfil de liberación fue obtenido con la formulación 4 (Figura 1), dado que la liberación de extracto de los parches fue muy rápida, lo cual representa una ventaja para esta forma de dosificación.

La liberación de propóleo también inició a los 2 minutos, pero en menor magnitud en comparación con la liberación de *Echinacea* (Figuras 1 y 2). En los primeros 10 minutos, no se observó diferencia entre las formulaciones. Sin embargo, a los 15 minutos, las formulaciones 4, 5 y 10 liberaron 25, 42 y 20% de propóleo, respectivamente, y las formulaciones 7 y 12 liberaron únicamente 12 y 18%, respectivamente. Tomando como base estos resultados, la liberación de los extractos en las

formulaciones 4 y 5 fueron estimadas a los primeros 20 minutos de su disolución con la finalidad de decidir cuál formulación presentaba las mejores características de disolución. Los resultados mostraron solo una ligera diferencia, en el extracto de *Echinacea* liberado (más de 50% del extracto liberado para la formulación 4 y 47% para la formulación 5). En tanto para el propóleo en las mismas formulaciones se observó una mayor diferencia.



**Figura 1. Perfiles de disolución de propóleo de los parches bucales en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.6:**  
● formulación 4, □ formulación 5, △ formulación 7, ■ formulación 10 y ♦ formulación 12. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones ± EEM.

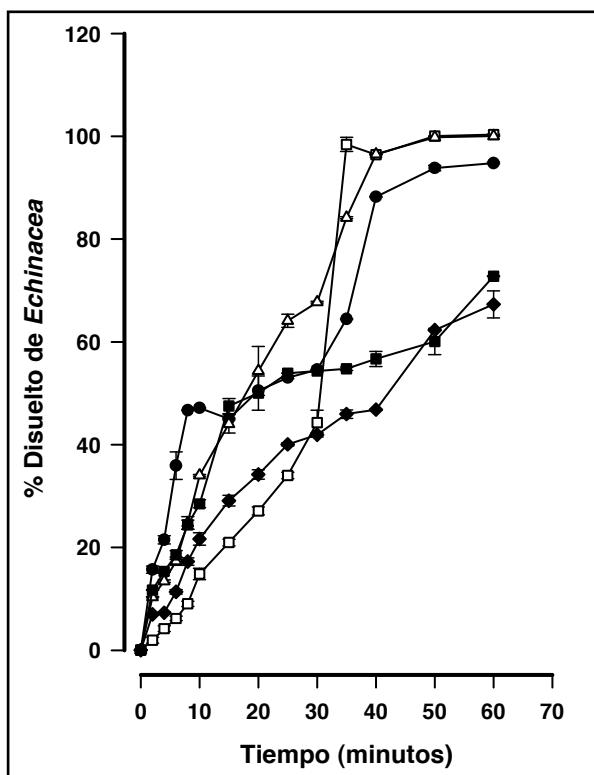


Figura 2. Perfiles de disolución de Echinacea de los parches bucales en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.6:  
● formulación 4, □ formulación 5, △ formulación 7, ■ formulación 10 y ♦ formulación 12. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones ± EEM.

La eficiencia de disolución es un parámetro que puede ser utilizado para la comparación de perfiles de disolución. La eficiencia de disolución es definida como el área bajo la curva de disolución en un momento determinado y se expresa como un porcentaje de la superficie del rectángulo descrito por el 100% de disolución en ese momento (%ED), este parámetro está relacionado con la cantidad de fármaco que está disuelto en el medio y sugiere un mejor pronóstico de los resultados *in vivo*, debido a que la biodisponibilidad se calcula mediante la integración del área bajo la curva de concentración plasmática y en los resultados de la disolución *in vitro* se expresan como el área bajo la curva de la cantidad de fármaco disuelto.<sup>26,27</sup>

Los resultados de %ED a los 30 minutos se obtuvieron con el propósito de evaluar la disolución de los compuestos en las formulaciones a ese tiempo (Tabla 5). La comparación estadística entre el promedio de %ED entre las formulaciones 4, 5, 7, 10 y 12 para *Echinacea* y propóleo mostró una diferencia significativa entre la formulación 4 y las restantes para ambas sustancias de interés, evidenciando por tanto un mejor

comportamiento de disolución para la formulación 4 en ambos compuestos. Considerando que la formulación 4 presentó una menor dispersión de sus valores en todas las determinaciones realizadas, y registró un perfil de disolución más satisfactorio a una forma farmacéutica de liberación inmediata, la mejor propuesta para un parche bucal de *Echinacea* y propóleo resultó ser la formulación 4.

Tabla 5. Eficiencia de disolución a los 30 minutos para *Equinacea* y propóleo

Formulación	<i>Equinacea</i>	Propóleo
4	87 ± 0.43	65 ± 0.37
5	69 ± 3.66*	68 ± 1.76
7	83 ± 5.33	30 ± 1.17*
10	77 ± 0.55*	43 ± 2.70*
12	53 ± 1.86*	36 ± 0.58*

Los valores representan el promedio ± la DE (n = 3).

\*p < 0.05, ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

## Conclusiones

Los parches bucales conteniendo propóleo y *Echinacea purpurea* realizados con la formulación 4, mostraron propiedades mecánicas, mucoadhesivas y de hinchamiento que permitieron una mayor liberación de los compuestos de la forma farmacéutica, por lo que resultó ser la mejor. Esta es la primera formulación de parches que contienen propóleo y *Echinacea*, los cuales son remedios tradicionales que han demostrado propiedades farmacológicas que justifican su uso en odontología.

## Agradecimientos

Este estudio fue parcialmente financiado con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto PAPIIT IN 209810).

## Referencias

1. Sekhar KC, Naidu KV, Vishnu YV, Gannu R, Kishan V, Rao YM. Transbuccal delivery of chlorpheniramine maleate from mucoadhesive buccal patches. Drug Delivery. 2008; 15(3):185-191.

2. Vishnu YV, Chandrasekhar K, Ramesh G, Rao YM. Development of mucoadhesive patches for buccal administration of carvedilol. *Current Drug Delivery*. 2007; 4(1):27-39.
3. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998; 36(4):347–363.
4. Rezende PG, Costa RL, Pimenta FC, Baroni AD. In vitro antimicrobial activity of endodontic pastes with propolis extracts and calcium hydroxide: a preliminary study. *Braz Dent J*. 2008; 19(4):301-305.
5. Paulino N, Teixeira C, Martins R, Scrimin A, Dirsch VM, Vollmar AM, Abreu SR, de Castro SL, Marcucci MC. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med*. 2006; 72(10):899-906.
6. Giusti F, Miglietta R, Pepe P, Seidenari S. Sensitization to propolis in 1255 children undergoing patch testing. *Contact Dermatitis*. 2004; 51(5-6):255-258.
7. Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Araújo JP Jr, Sforcin JM. The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phytother Res*. 2010; 24(10):1501–1507.
8. Birudaraj R, Berner B, Shen S, Li X. Buccal permeation of buspirone: mechanistic studies on transport pathways. *J Pharm Sci*. 2005; 94(1):70-78.
9. Senel S, Hincal AA. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *J Control Release*. 2001; 72(1-3):133-144.
10. Squier CA. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1991; 2(1):13-32.
11. Shojaei AH. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharmol Sci*. 1998 1(1):15-30.
12. Gispert-Abren E, Cantillo-Estrada E, Rivero-López A, Padrón-Illance M. Actividad anticaries de una crema dental con propóleos. *Rev Cubana Estomatol*. 2000; 37(3):166-170.
13. Barnes J, Anderson LA, Gibbons S, Phillipson JD. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. *J Pharm Pharm*. 2005; 57(8):929-954.
14. Raso GM, Pacilio M, Di Carlo G, Esposito E, Pinto L, Meli R. In vivo and *in vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. *J Pharm Pharm*. 2002; 54(10):1379-1383.
15. Cohen HA, Varsano I, Kahan E, Sarrell EE, Uziel Y. Effectiveness of an herbal preparation containing *Echinacea*, propolis and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004; 158(3):217-221.
16. Colombo BM. Control of physical properties pharmaceutical forms. 1<sup>a</sup>. Ed. Milano (Italy): Organizzazione Editoriale Medico-Farmaceutica Via Edolo; 1976, p. 211.
17. Nafee NA, Boraie MA, Ismail FA, Mortada LM. Design and characterization of mucoadhesive buccal patches containing cetylpyridinium chloride. *Acta Pharma*. 2003; 53(3):199-212.
18. Chun MK, Kwak BT, Choi HK. Preparation of buccal patch composed of carbacol, poloxamer and hydroxypropyl methylcellulose. *Arch Pharm Res*. 2003; 26(11):973-978.
19. Wong CF, Yuen KH, Peh KK. Formulation and evaluation of controlled release Eudragit buccal patches. *Inter J Pharma*. 1999; 178(1):11-22.
20. Delgado MI, Cucala J, Obach R. Validation of an automated sampling system with Franz diffusion cell. *Drug Dev Ind Pharm*. 1994; 20(14):2267-2283.
21. Oomah BD, Dumon D, Cardador-Martínez A, Godfrey DV. Characteristics of *Echinacea* seed oil. *Food Chem*. 2006; 96(2):304-312.
22. González M, Guzmán B, Rudyk R, Romero E, Molina MA. Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis. *Acta Farm Bonaer*. 2003; 22(3):243-248.
23. ICH Expert Working Group ICH Harmonised tripartite guideline validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). Step 4:1–18 (2005).
24. Perioli L, Ambrogi V, Angelici F, Ricci M, Giovagnoli S, Capuccella M, Rossi C. Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. *J Control Release*. 2004; 99(1): 73-82.
25. Salamat-Miller N, Chittchang M, Johnston TP. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57(11): 1666-1691.
26. Khan KA, Rhodes CT. The concept of dissolution efficiency. *J Pharm Pharmacol*. 1975; 27: 48-49.
27. Ofoefule SI, Udeogaranya PO, Okonta JM. Prediction of *in vivo* bioavailability of six brands of ciprofloxacin film coated tablets using the concept dissolution efficiency (DE). *Boll Chim Farm*. 2001; 140(3):187-191.