UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

RENATA BARBOSA BODINI

**Desenvolvimento de filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva
baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*)**

Pirassununga

2015

RENATA BARBOSA BODINI

**Desenvolvimento de filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva
baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*)**

(versão corrigida)

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary
Aparecida de Carvalho

Pirassununga

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

B667d Bodini, Renata Barbosa
Desenvolvimento de filmes de desintegração oral
incorporados com os extratos de erva baleeira (*Cordia
verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*) / Renata Barbosa
Bodini. -- Pirassununga, 2015.
168 f.
Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
Departamento de Engenharia de Alimentos.
Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.
Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de
Carvalho.

1. Macromoléculas 2. Fitoterápico 3. Extratos
vegetais 4. Flavonóides 5. Curcuminóides 6. Antioxidante
7. Antimicrobiano 8. Anti-inflamatório. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar e abençoar minha vida.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos pela estrutura que permitiu a realização deste trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado, que permitiu dedicação exclusiva a este trabalho.

À professora Rosemary Aparecida de Carvalho por sua orientação.

À professora Judite Lapa Guimarães por sua colaboração profissional e ensinamentos na etapa de análise sensorial dos filmes de desintegração oral, e por toda sua disponibilidade, atenção e gentileza.

À professora Mariza Pires de Melo por permitir o uso do laboratório de Química Biológica e de toda estrutura disponível, que foi imprescindível na finalização deste trabalho, e também por sua confiança, atenção e gentileza.

À professora Andrezza Maria Fernandes por disponibilizar o laboratório Multiusuário de Microbiologia para a realização das análises de atividade antimicrobiana.

À professora Eliana Setsuko Kamimura por disponibilizar o laboratório de Bioprocessos para a realização das análises da atividade antimicrobiana.

À Carla Monaco, técnica do laboratório Multiusuário de Alimentos, por sua ajuda, disponibilidade e atenção sempre.

À Silvana Piccoli Pugine, especialista do laboratório de Química Biológica, por sua fundamental colaboração profissional na realização das análises da atividade anti-inflamatória e, além disso, por sua paciência, disponibilidade e delicadeza.

À Adna Prado Massarioli, especialista do laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ, por sua colaboração profissional nas análises da atividade antioxidante pelo método ORAC, e também por toda atenção e gentileza.

À Sílvia Seraphin de Godoy, técnica do laboratório Multiusuário de Microbiologia, pela ajuda profissional, atenção e ensinamentos durante a realização das análises da atividade antimicrobiana.

Ao Marcelo Thomazini, especialista do laboratório de Produtos Funcionais, por sua ajuda profissional, ensinamentos, disponibilidade e amizade.

Aos técnicos Guilherme Silva e Nilson Ferreira pelo profissionalismo e colaboração sempre que necessário.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, e aos estagiários do laboratório multiusuário de análise de alimentos, pelos ensinamentos, conversas, risadas, e momentos de descontração, que também foram fundamentais durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Cargill Agrícola S/A pela doação do amido pré-gelatinizado.

À Colorcon do Brasil LTDA pela doação da hidroxipropilmetil celulose.

À Fundação André Toselo pela doação das cepas dos microrganismos.

Muito obrigada a todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

BODINI, R. B. **Desenvolvimento de filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*)**. 2015. 168f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Os filmes de desintegração oral são dosagens farmacêuticas que apresentam como vantagens a facilidade de administração e não necessidade de água, e poderiam possibilitar, além de medicamentos alopáticos tradicionais, a incorporação de extratos de plantas utilizadas na medicina popular. Logo, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes de desintegração oral produzidos a partir de macromoléculas naturais e incorporados com extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*), que apresentam importantes atividades farmacológicas. Os extratos de erva baleeira e cúrcuma, produzidos com 20g de planta/100 mL de álcool 80%, apresentaram as maiores concentrações de flavonóides e curcuminóides, respectivamente, e foram concentrados e utilizados na produção dos filmes. Os filmes de desintegração oral foram produzidos por *casting* com diferentes concentrações de amido pré-gelatinizado e hidroxipropilmetil celulose, e sorbitol como plastificante. A formulação do filme selecionada através da caracterização foi utilizada para a produção dos filmes incorporados com os extratos. Na produção dos filmes bioativos, os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram adicionados à solução filmogênica de modo que cada dose unitária de filme (6 cm²) apresentasse as concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides ou curcuminóides. Foram caracterizados quanto ao aspecto visual, microscopia, espectroscopia de infravermelho (FTIR), propriedades mecânicas, mucoadesividade *in vitro*, e tempo de desintegração *in vitro* e *in vivo*. Os filmes com os extratos foram quantificados quanto ao teor de flavonóides e curcuminóides. Os extratos e os filmes bioativos foram caracterizados quanto à atividade antioxidante *in vitro* (DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu e ORAC), atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*, atividade anti-inflamatória *in vitro* (inibição da enzima COX-2), e avaliados quanto à estabilidade de flavonóides e curcuminóides em condições controladas de umidade e temperatura (25°C-60% UR e 40°C-75% UR), por 90 dias. Os filmes bioativos foram avaliados sensorialmente através de um teste de aceitação. Os extratos de erva baleeira e cúrcuma concentrados obtiveram os valores de 1,2 mg eq. quercetina/mL de extrato e 16,3 mg eq.de curcumina/mL de extrato,

respectivamente. A formulação 80A:20HPMC, apresentou boas características mecânicas e o menor tempo de desintegração *in vivo*, sendo selecionada para a produção dos filmes com os extratos vegetais. Os filmes com os extratos apresentaram boas características visuais, mas com alterações microscópicas. As análises de FTIR revelaram que os picos de absorção foram ligeiramente deslocados com a adição dos extratos. Os extratos de erva baleeira e cúrcuma promoveram mudanças significativas nas propriedades mecânicas dos filmes, redução da mucoadesividade, e aumento do tempo de desintegração *in vitro*. A quantificação de flavonóides e curcuminóides nas doses unitárias dos filmes revelou a uniformidade das mesmas em todas as concentrações. Os extratos e os filmes bioativos apresentaram propriedades antioxidantes, no entanto apenas os filmes com extrato de erva baleeira foram efetivos contra *Streptococcus mutans*. O extrato de erva baleeira e os filmes com este extrato apresentam atividade anti-inflamatória *in vitro*, com inibições de COX-2 entre 71 e 90,5%. O extrato de cúrcuma apresentou uma inibição de 86,1%, mas os filmes com extrato apresentaram atividade reduzida. Os extratos e os filmes bioativos apresentaram excelente estabilidade de flavonóides e curcuminóides, em função do armazenamento. O teste sensorial mostrou que os filmes com cúrcuma apresentaram melhor aceitação do consumidor do que os filmes com erva baleeira, principalmente devido ao sabor amargo do extrato de erva baleeira. Logo, este estudo mostrou a possibilidade de produção de filmes de desintegração oral aditivados com extratos de plantas e a manutenção das propriedades funcionais dos extratos nos filmes.

Palavras-chave: macromoléculas, fitoterápico, extratos vegetais, flavonóides, curcuminóides, antioxidante, antimicrobiano, anti-inflamatório.

ABSTRACT

BODINI, R. B. **Development of oral disintegrating films incorporated with extracts of *Cordia verbenacea* and *Curcuma longa***. 2015. 168f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

Oral disintegrating films are pharmaceutical dosages that have the following advantages: they are easy to be administered, there is no need to use water and they may enable, besides their use in traditional allopathic drugs, the incorporation of plant extracts used in popular medicine. The objective of this study was to develop oral disintegrating films from natural macromolecules and incorporated with *Cordia verbenacea* and *Curcuma longa* extracts, which present important pharmacological activity. *Cordia verbenacea* and *Curcuma longa* extracts produced with 20g of the plant / 100 mL of 80% alcohol showed the greatest concentrations of flavonoids and curcuminoids, respectively, and were concentrated and used in film production. Oral disintegrating films were produced by casting with different concentrations of pre-gelatinized starch and hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), and with sorbitol as the plasticizing agent. Film formulation that was selected by characterization was used in the production of films incorporated with the extracts. *Cordia verbenacea* and *Curcuma longa* extracts were added to the filmogenic solution in a way that each film unit (6 cm²) presented 0.25; 0.50; and 0.75mg of flavonoids and curcuminoids. Films were analyzed in terms of appearance, microscopy, infrared spectroscopy (FTIR), mechanical properties, in vitro mucoadhesiveness, and in vitro and in vivo disintegration time. Films with the extracts were analyzed quantitatively for flavonoid and curcuminoid concentration. Extracts and bioactive films were characterized in terms of in vitro antioxidant activity (DPPH, FRAP, Folin-Ciocalteu and ORAC), antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*, in vitro inflammatory activity (COX-2 inhibition), and were evaluated for flavonoid and curcuminoid stability in controlled relative humidity and temperature conditions (25°C-60% RH and 40°C-75% RH) for 90 days of storage. Bioactive films were submitted to sensory evaluation by acceptance testing. Concentrated *Cordia verbenacea* and *Curcuma longa* extracts showed 1.2mg eq. quercetin/mL of extract, and 16.3 mg eq. curcumin/mL of extract, respectively. The formula 80A:20HPMC showed good mechanical characteristics and shorter in vivo disintegration time, and was selected for the production of films with plant extracts. Films with the extracts showed adequate visual appearance, but microscopic changes. FTIR showed

absorption peaks that were slightly displaced with the addition of the extracts. *Cordia verbenacea* and *Curcuma longa* extracts led to significant changes in the mechanical properties of the films, reduced mucoadhesiveness, and increased in vitro disintegration times. The quantification of flavonoids and curcuminoids in film units was uniform in all concentrations. The extracts and bioactive films showed antioxidant properties. However, only films with *Cordia verbenacea* were effective against *Streptococcus mutans*. *Cordia verbenacea* extract and films with this extract showed in vivo anti-inflammatory activity, with 71 and 90.5% of COX-2 inhibition. *Curcuma longa* showed inhibition of 86.1%, but the films with the extract had reduced activity. The extracts and bioactive films showed excellent stability of flavonoids and curcuminoids during storage. Sensory testing showed that films with *Curcuma longa* were better accepted by the consumer than films with *Cordia verbenacea*. Thus, this study demonstrated the possibility of producing oral disintegrating films added with plant extracts with the maintenance of functional properties of the extracts used in the films.

Keywords: macromolecules, phytotherapy, plant extracts, flavonoids, curcuminoids, antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory.

Lista de Figuras

Figura 1. Fórmula estrutural da amilose.....	12
Figura 2. Fórmula estrutural da amilopectina.....	13
Figura 3. Estrutura química da HPMC.....	16
Figura 4. Erva baleeira - <i>Cordia verbenacea</i>	18
Figura 5. Fórmula estrutural básica dos flavonóides.....	21
Figura 6. Fórmula estrutural de alguns flavonóides.....	22
Figura 7. Rizoma de <i>Curcuma longa</i> e a cúrcuma em pó.....	24
Figura 8. Estrutura química dos curcuminóides: (A) curcumina, (B) demetoxicurcumina, (C) bisdemetoxicurcumina.....	27
Figura 9. Termo de consentimento livre e esclarecido de participação na avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral.....	42
Figura 10. Ficha de avaliação sensorial utilizada na análise descritiva quantitativa (ADQ).....	44
Figura 11. Termo de consentimento livre e esclarecido de participação na avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	57
Figura 12. Ficha de avaliação sensorial do teste de aceitação dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	58
Figura 13. Imagens da superfície dos filmes de desintegração oral obtidas por microscopia eletrônica de varredura em função da variação da relação (%) entre amido (A): hidroxipropilmetil celulose (HPMC): (a) 10A:90HPMC (1200x); (b) 20A:80HPMC (1200x); (c) 30A:70HPMC (1200x); (d) 40A:60HPMC (1200x); (e) 50A:50HPMC (1200x); (f) 60A:40HPMC (1200x).....	63
Figura 14. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A): hidroxipropilmetil celulose (HPMC) nas formulações: (a) 0A:100HPMC, imagem da superfície (1200x); (b) 0A:100HPMC, imagem da fratura (2000x); (c) 100A:0HPMC, imagem da superfície (1200x); (d) 100A:0HPMC, imagem da fratura (2000x); (e) 90A:10HPMC, imagem da superfície (1200x); (f) 90A:10HPMC, imagem da fratura (2000x); (g) 80A:20HPMC, imagem da superfície (1200x); (h) 80A:20HPMC, imagem da fratura (2000x); (i) 70A:30HPMC, imagem da superfície (1200x); (j) 70A:30HPMC, imagem da fratura (2000x).....	65

Figura 15. Espectros de infravermelho dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC): (1) 100A:0HPMC, (2) 90A:10HPMC, (3) 80A:20HPMC, (4) 70A:30HPMC, (5) 0A:100HPMC.....68

Figura 16. Exemplos dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma: (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO; (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO; (c) 0,75 mg de flavonóides/ FDO; (d) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO; (e) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO; (f) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.....80

Figura 17. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO): (a) 0 mg, imagem da superfície (1200x); (b) 0 mg, imagem da fratura (1500x) (c) 0,25 mg, imagem da superfície (300x); (d) 0,25 mg, imagem da fratura (1500x); (e) 0,50 mg, imagem da superfície (300x); (f) 0,50 mg, imagem da fratura (1500x); (g) 0,75 mg, imagem da superfície (300x); (h) 0,75 mg, imagem da fratura (1500x).....82

Figura 18. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO): (a) 0 mg, imagem da superfície (1200x); (b) 0 mg, imagem da fratura (1500x) (c) 0,25 mg, imagem da superfície (300x); (d) 0,25 mg, imagem da fratura (1500x); (e) 0,50 mg, imagem da superfície (300x); (f) 0,50 mg, imagem da fratura (1500x); (g) 0,75 mg, imagem da superfície (300x); (h) 0,75 mg, imagem da fratura (1500x).....83

Figura 19. Espectros de infravermelho (FTIR) dos filmes de desintegração incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira: (1) 0 mg de flavonóides/ FDO, (2) 0,25 mg de flavonóides/ FDO, (3) 0,50 mg de flavonóides/ FDO, (4) 0,75 mg de flavonóides/ FDO.....85

Figura 20. Espectros de infravermelho (FTIR) dos filmes de desintegração incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma: (1) 0 mg de curcuminóides/ FDO, (2) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO, (3) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, (4) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.....87

Figura 21. Efeito da concentração dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO) sobre a força mucoadesiva (N) dos filmes de desintegração oral.....93

- Figura 22.** Estudo da liberação *in vitro* dos flavonóides (%) em função do tempo (minutos) nas doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporadas com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).....99
- Figura 23.** Estudo da liberação *in vitro* dos curcuminóides (%) em função do tempo (minutos) nas doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporadas com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).....101
- Figura 24.** Atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*: A - (a) filme de desintegração oral sem extrato (80A:20HPMC), (b) controle positivo (antibiótico cloranfenicol); B - (a) extrato de cúrcuma, (b) extrato de erva baleeira; C - (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO, (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO, (c) 0,75 mg de flavonóides/ FDO; D - (a) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO, (b) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, (c) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.....112
- Figura 25.** Atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*: A - filme de desintegração oral sem extrato (80A:20HPMC); B - (a) extrato de erva baleeira, (b) extrato de cúrcuma; C - (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO, (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO, (c) 0,75 mg de flavonóides/ FDO; D - (a) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO, (b) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, (c) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.....114
- Figura 26.** Efeito do tempo de armazenamento (90 dias) na concentração de flavonóides (mg eq. de quercetina/ mL de extrato) do extrato de erva baleeira acondicionado nas temperaturas de 25°C e 40°C.....120
- Figura 27.** Efeito do tempo de armazenamento (90 dias) na concentração de curcuminóides (mg eq de curcumina/ mL de extrato) do extrato de cúrcuma acondicionado nas temperaturas de 25°C e 40°C.....121
- Figura 28.** Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (25°C - 60% UR) na concentração de flavonóides (mg eq. de quercetina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).....122
- Figura 29.** Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (40°C - 75% UR) na concentração de flavonóides (mg eq de quercetina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).....123

- Figura 30.** Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (25°C - 60% UR) na concentração de curcuminóides (mg eq. de curcumina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (0,25, 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).....124
- Figura 31.** Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (40°C - 75% UR) na concentração de curcuminóides (mg eq. de curcumina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (0,25, 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).....125
- Figura 32.** Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (25°C - 60% UR) na atividade anti-inflamatória (% de inibição de COX-2) do extrato de erva baleeira e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).....128
- Figura 33.** Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (40°C - 75% UR) na atividade anti-inflamatória (% de inibição de COX-2) do extrato de erva baleeira e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).....128
- Figura 34.** Doses unitárias (FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira: (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO; (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO; 0,75 mg de flavonóides/ FDO; e cúrcuma: : (a) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO; (b) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO; 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.....129

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de filmes de desintegração oral comercializados contendo diferentes princípios ativos.....	10
Tabela 2. Formulação dos filmes de desintegração oral em função da concentração (g/ 100g de solução filmogênica) de amido pré-gelatinizado (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).....	36
Tabela 3. Concentração de flavonóides no extrato de erva baleeira em função da variação da relação planta/ solvente utilizada na extração.....	59
Tabela 4. Concentração de curcuminóides no extrato de cúrcuma em função da variação da relação planta/ solvente utilizada na extração.....	60
Tabela 5. Concentração de flavonóides (mg eq. de quercetina/ mL de extrato) e curcuminóides (mg eq. de curcumina/ mL de extrato) nos extratos concentrados de erva baleeira e cúrcuma.....	60
Tabela 6. Espessura (mm), umidade (g de água/100 g de filme), tensão na ruptura (T), alongação (E), e módulo elástico (ME) dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).....	70
Tabela 7. Força mucoadesiva (F) dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).....	71
Tabela 8. Tempo de desintegração <i>in vitro</i> dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).....	74
Tabela 9. Notas atribuídas aos filmes de desintegração oral através da análise descritiva quantitativa (ADQ) em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).....	76
Tabela 10. Concentrações dos extratos de erva baleeira e cúrcuma utilizadas na produção dos filmes de desintegração oral (FDO) em função das diferentes concentrações de flavonóides e curcuminóides nas doses unitárias (0,25; 0,50 e 0,75 mg/ FDO).....	78
Tabela 11. Espessura e umidade dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).....	89
Tabela 12. Tensão na ruptura (T), alongação (E) e módulo elástico (ME) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).....	91

Tabela 13. Tempo de desintegração <i>in vitro</i> dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).....	95
Tabela 14. Concentração real de flavonóides (mg eq. de quercetina/ FDO) e curcuminóides (mg eq. de curcumina/FDO) nas doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com diferentes concentrações teóricas dos extratos de erva baleeira (0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).....	97
Tabela 15. Valores de aceitação (VA) ^c das doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporadas com os extratos de erva baleeira e cúrcuma em diferentes concentrações (0,25; 0,50 e 0,75 mg do princípio ativo/ FDO).....	98
Tabela 16. Porcentagem (%) de inibição do radical DPPH pelos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).....	104
Tabela 17. Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu pelos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonoides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).....	106
Tabela 18. Poder redutor do ferro (FRAP) nos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).....	107
Tabela 19. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) nos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).....	110
Tabela 20. Atividade anti-inflamatória do extrato de erva baleeira e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato (mg de flavonóides/ FDO) através da inibição da enzima COX-2 (%).....	117
Tabela 21. Atividade anti-inflamatória do extrato de cúrcuma e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO) através da inibição da enzima COX-2 (%).....	119
Tabela 22. Médias dos atributos aparência, conforto, sabor, sensação e aceitação global obtidas na avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).....	131

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Filmes de desintegração oral.....	4
2.1.1. Filmes de desintegração oral incorporados com diferentes princípios ativos.....	6
2.1.2. Patentes e marcas comerciais.....	9
2.2. Macromoléculas.....	11
2.2.1. Amido.....	11
2.2.2. Hidroxipropilmetil celulose (HPMC).....	15
2.3. Plantas medicinais.....	17
2.3.1. Erva baleeira (<i>Cordia verbenacea</i>).....	18
2.3.1.1. Flavonóides.....	20
2.3.2. Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>).....	23
2.3.2.1. Curcuminóides.....	26
3. OBJETIVOS.....	29
3.1. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Material.....	31
4.2. Produção e caracterização dos extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	32
4.2.1. Extração.....	32
4.2.2. Determinação da concentração de flavonóides e curcuminóides.....	33
4.2.2.1. Determinação da concentração de flavonóides no extrato de erva baleeira.....	33
4.2.2.2. Determinação da concentração de curcuminóides no extrato de cúrcuma.....	34
4.2.3. Concentração dos extratos.....	34
4.3. Produção dos filmes de desintegração oral.....	35
4.3.1. Filmes de desintegração oral sem extrato.....	35
4.3.2. Filmes de desintegração oral incorporados com os extrato de erva baleeira e cúrcuma.....	36
4.4. Caracterização dos filmes de desintegração oral.....	37
4.4.1. Aspectos visuais.....	37
4.4.2. Microscopia eletrônica de varredura.....	38
4.4.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	38
4.4.4. Propriedades mecânicas.....	39
4.4.5. Mucoadesividade <i>in vitro</i>	39
4.4.6. Tempo de desintegração <i>in vitro</i>	40

4.4.7. <i>Desintegração in vivo</i>	40
4.5. Quantificação de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral produzidos com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	45
4.6. Uniformidade da concentração de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral.....	46
4.7. Estudo da liberação <i>in vitro</i> de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral.....	47
4.8. Propriedades funcionais dos extratos e dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	47
4.8.1. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	47
4.8.1.1. <i>Sequestro de radicais livres DPPH</i>	48
4.8.1.2. <i>Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu</i>	49
4.8.1.3. <i>Determinação do poder redutor do ferro (FRAP)</i>	50
4.8.1.4. <i>Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)</i>	51
4.8.2. <i>Atividade antimicrobiana</i>	53
4.8.3. <i>Atividade anti-inflamatória</i>	54
4.9. Estabilidade.....	55
4.10. Avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	56
4.11. Análise estatística.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Produção e caracterização dos extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	59
5.2. Filmes de desintegração oral sem extrato.....	61
5.2.1. <i>Aspecto visual</i>	61
5.2.2. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	61
5.2.3. <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	66
5.2.4. <i>Propriedades mecânicas</i>	68
5.2.5. <i>Mucoadesividade in vitro</i>	71
5.2.6. <i>Tempo de desintegração in vitro</i>	73
5.2.7. <i>Desintegração in vivo</i>	75
5.3. Filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	77
5.3.1. <i>Aspecto visual</i>	79
5.3.2. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	81
5.3.3. <i>Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	84
5.3.4. <i>Propriedades mecânicas</i>	88
5.3.5. <i>Mucoadesividade in vitro</i>	92
5.3.6. <i>Tempo de desintegração in vitro</i>	94

5.3.7. <i>Quantificação de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral e uniformidade das doses unitárias</i>	96
5.3.8. <i>Estudo da liberação in vitro de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral</i>	98
5.4. Propriedades funcionais nos extratos e nos filmes.....	102
5.4.1. <i>Atividade antioxidante in vitro</i>	102
5.4.1.1. <i>Sequestro dos radicais DPPH</i>	102
5.4.1.2. <i>Redução do reagente Folin-Ciocalteu</i>	105
5.4.1.3. <i>Determinação do poder redutor do ferro (FRAP)</i>	107
5.4.1.4. <i>Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)</i>	109
5.4.2. <i>Atividade antimicrobiana</i>	110
5.4.3. <i>Atividade anti-inflamatória</i>	116
5.5. Estabilidade.....	119
5.5.1. <i>Extratos de erva baleeira e cúrcuma</i>	119
5.5.2. <i>Filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma</i> ..	121
5.5.3. <i>Atividade anti-inflamatória</i>	126
5.6. Avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.....	129
6. CONCLUSÃO.....	133
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	136

1. INTRODUÇÃO

Muitas empresas farmacêuticas têm direcionado suas pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos com novas formas de dosagem. E uma forma de dosagem relativamente nova é o filme de desintegração oral, que consiste em um filme fino preparado a partir de polímeros hidrofílicos e que rapidamente se dissolve na língua ou na cavidade bucal (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Uma vez que esses filmes orais tornaram-se rapidamente populares no mercado, na forma de refrescantes bucais, não seriam necessários maiores esforços para instruir a população sobre a técnica de administração desta forma farmacêutica, que também apresenta entre outras vantagens a facilidade de administração e a não necessidade de água (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Diferentes princípios ativos podem ser incorporados a este sistema, como remédios para tosse e resfriado, dor de garganta, medicamentos para a disfunção erétil, anti-histamínicos, antiasmáticos, distúrbios gastrointestinais, náuseas e dor (DIXIT; PUTHLI, 2009).. Outras aplicações incluem cafeína, vitaminas e auxiliadores do sono (DIXIT; PUTHLI, 2009). Entretanto, no Brasil, o único medicamento que se encontra disponível nas farmácias sob esta forma de administração é o Trimedal® Tosse, da empresa Novartis.

Este tipo de sistema poderia também ser utilizado para a incorporação de extratos vegetais com propriedades farmacológicas, sobretudo em função da importância destas substâncias como agentes terapêuticos desde tempos antigos na medicina popular. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 65-80% da população mundial nos países em desenvolvimento, devido à pobreza e à falta de acesso à medicina moderna, dependem essencialmente de plantas para os seus cuidados de saúde primários (CALIXTO, 2005).

Esta área tem recebido muita atenção no Brasil e na maioria dos países latino-americanos, tanto do ponto de vista da comunidade acadêmica e, principalmente, das empresas farmacêuticas. A ideia básica é utilizar plantas medicinais para desenvolver fitoterápicos padronizados, com eficácia comprovada, segurança e alta qualidade (CALIXTO, 2005). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2014), os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se, exclusivamente derivados de drogas vegetais, e devem ser caracterizados por sua qualidade, eficácia e riscos de seu uso. No Brasil, os fitoterápicos são regulamentados como medicamentos convencionais, tendo que apresentar critérios similares de qualidade, segurança e eficácia requeridos pela ANVISA para todos os medicamentos, cujas exigências estão definidas na Resolução RDC nº14 de 2010. Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um fitoterápico, evitam-se contaminações por microrganismos, agrotóxicos e substâncias estranhas, além do que é possível padronizar a quantidade e a forma correta de uso, permitindo maior segurança (ANVISA, 2014).

É importante ressaltar que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimula os governos a estabelecerem políticas para medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, no intuito de que os países utilizem recursos naturais disponíveis em seus próprios territórios para promover a atenção primária à saúde (ANVISA, 2014).

Considerando então esta perspectiva, a incorporação de extratos vegetais com propriedades anti-inflamatórias em filmes de desintegração oral poderia ser uma forma de disponibilizar dosagens adequadas e conhecidas destas substâncias, fornecer uma nova forma de administração, além de infusões e extratos, minimizar o uso de drogas sintéticas e de seus efeitos colaterais, além de valorização da flora brasileira. Entre as plantas encontradas no Brasil, que apresentam propriedades anti-inflamatórias, pode-se citar a erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e a cúrcuma (*Curcuma longa*), largamente utilizadas na medicina popular, e também estudadas cientificamente quanto suas propriedades.

Em virtude das vantagens que podem ser oferecidas pelas dosagens farmacêuticas na forma de filmes de desintegração oral, aliada à possibilidade de utilização de plantas já utilizadas na medicina popular e com importantes atividades farmacológicas, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes de desintegração oral produzidos a partir de macromoléculas naturais e incorporados com os extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Filmes de desintegração oral

A mucosa oral tem muitas propriedades que a tornam um local atrativo para a liberação de drogas, mas também oferece muitos desafios para os pesquisadores que investigam novas técnicas de liberação. Muitas formulações diferentes incluindo sprays, comprimidos, enxaguantes bucais, géis, pastas e adesivos são atualmente usados para liberação no interior ou através da mucosa oral (HEARNDEN et al., 2012).

No entanto, apesar dos desafios, a rota oral para a liberação de substâncias farmacêuticas ativas, que são passíveis de alto nível de degradação no trato gastrointestinal, ainda é a preferida (DIXIT; PUTHLI, 2009). De acordo com Hearnden et al. (2012), a liberação através da mucosa tem a vantagem de liberar as drogas diretamente na circulação sistêmica, evitando a primeira passagem do metabolismo da droga no fígado e a eliminação pré-sistêmica no trato gastrointestinal.

A pesquisa e o desenvolvimento no segmento de drogas de liberação oral levaram à transição de formas farmacêuticas convencionais como os comprimidos e cápsulas de desintegração oral para o desenvolvimento de lâminas orais, que, basicamente, podem ser consideradas como filmes ultrafinos, do tamanho de um selo, contendo um agente ativo ou um ingrediente farmacêutico, que são preparados usando polímeros hidrofílicos que rapidamente se dissolvem na língua ou na cavidade bucal (DIXIT; PUTHLI, 2009).

As vantagens de conveniência de dosagem e de portabilidade do filme de desintegração oral levaram a uma maior aceitação desta forma de dosagem em pacientes das áreas pediátrica e geriátrica (DIXIT; PUTHLI, 2009). Entre as vantagens associadas aos

filmes orais, pode-se citar a maior área superficial, que leva à rápida desintegração e dissolução na cavidade bucal, a facilidade de deglutição e a não necessidade de água (DIXIT; PUTHLI, 2009). Além do que, a mucosa oral é altamente vascularizada e as drogas podem ser absorvidas diretamente, entrando na circulação sistêmica sem ser submetidas à primeira passagem do metabolismo hepático, o que também poderia promover a redução da dose administrada, com consequente redução de possíveis efeitos colaterais (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Quanto à formulação, uma variedade de polímeros está disponível para a preparação dos filmes de desintegração oral, podendo ser utilizados sozinhos ou em combinação para se obter as propriedades desejadas (CORNIELLO, 2006), devendo ser atóxico, não irritante e livre de impurezas, facilmente disponíveis e não muito caros (DIXIT; PUTHLI, 2009). Deve-se considerar também que o filme obtido deve ser resistente o suficiente, a fim de que qualquer dano físico seja evitado durante o manuseamento ou transporte (CORNIELLO, 2006). Entretanto, os filmes devem ter a propriedade de se desintegrarem em segundos quando colocados na cavidade oral, liberando a droga instantaneamente (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Diferentes substâncias podem ser incorporadas neste sistema de liberação, como remédios para tosse e resfriado, dor de garganta, disfunção erétil, anti-histamínico, antiasmáticos, distúrbios gastrointestinais, náuseas e dor (DIXIT; PUTHLI, 2009). Quanto à concentração de compostos farmacologicamente ativos, geralmente de 5% a 30% podem ser incorporados nos filmes de desintegração oral (KULKARNI; KUMAR; SORG, 2003). Na literatura podem ser encontrados alguns estudos relacionados aos filmes de desintegração oral.

2.1.1. Filmes de desintegração oral incorporados com diferentes princípios ativos

Os filmes de desintegração oral têm sido estudados por diversos autores, que tem incorporado nessa forma de dosagem farmacêutica substâncias sintéticas amplamente conhecidas e com diferentes propriedades farmacológicas, mas comercializadas principalmente na forma de comprimidos. A seguir são apresentados os estudos nesta linha de pesquisa.

Abu-Huwaij et al. (2007) desenvolveram filmes à base do polímero carbopol (971P) incorporados com lidocaína, visando avaliar suas propriedades mucoadesivas.

Dinge e Nagarsenker (2008) produziram filmes de desintegração oral contendo hidroxipropilmetil celulose, goma xantana e incorporados com triclosan, uma substância antimicrobiana, e verificaram que esta forma de dosagem poderia melhorar a disponibilidade da droga. Okabe et al. (2008) produziram um novo tipo de formulação de um filme oral, que poderia ser utilizado por pessoas com dificuldade de deglutição e incorporado com diferentes drogas. Semalty, Semalty e Kumar (2008) prepararam filmes à base de hidroxipropilmetil celulose e carboximetil celulose sódica contendo glipizide (agente antidiabético), e concluíram a possibilidade de uso terapêutico dos mesmos. Sahni et al. (2008) verificaram que filmes orais à base de carboximetil celulose contendo insulina mostraram vantagens em relação às formulações convencionais quanto à invasividade, exigência de pessoas treinadas, e principalmente quanto à primeira passagem do metabolismo.

Shimoda et al. (2009) desenvolveram filmes de desintegração oral à base de celulose contendo dexametasona, cujos resultados mostraram a possibilidade de utilização dos mesmos como antieméticos durante a quimioterapia para tratamento de câncer. Nishimura et al. (2009) verificaram que filmes de desintegração oral contendo procloroperazina, composto

com propriedades antieméticas, mostraram-se potencialmente úteis no controle de efeitos colaterais ocasionados por medicamentos utilizados no tratamento de câncer ou por analgésicos opióides em pacientes com capacidade limitada de ingestão oral. Mishra e Amin (2009) desenvolveram filmes à base de hidroxipropilmetil celulose incorporados com dicloridrato de cetirizina, um anti-histamínico usado para tratar sintomas de alergia e rinite alérgica, cujos resultados mostraram elevada possibilidade de liberação oral da droga.

Meher et al. (2013) desenvolveram e caracterizaram filmes de desintegração oral de metil celulose e hidroxipropilmetil celulose contendo carvedilol, fármaco utilizado para o tratamento de hipertensão arterial, e comprovaram que os filmes poderiam ser utilizados para a liberação efetiva da droga na mucosa oral.

Govindasamy, Kesavan e Narasimha (2013) produziram filmes de liberação oral à base de HPMC, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona e etil celulose, contendo carbamazepina (antiepiléptico), e concluíram que os filmes representam um potencial sistema alternativo de liberação sistêmica da droga.

Avachat et al. (2013) produziram filmes à base do polímero carbopol 940 e de um polissacarídeo proveniente da semente de tamarindo, contendo benzoato rizatriptano (tratamento de dor de cabeça) como fármaco, e verificaram a boa permeabilidade da droga através de estudos de difusão em mucosa bucal de suíno. Jones et al. (2013) desenvolveram filmes de hidroxipropilmetil celulose e Eudragit[®] contendo o antirretroviral didanosina, e verificaram o potencial de uso dos mesmos para liberação bucal de fármacos e terapia dos pacientes. Shiledar et al. (2014) produziram filmes à base dos polímeros hidroxipropilmetil celulose e goma xantana, e incorporados com zolmitriptano, fármaco utilizado para o tratamento de enxaqueca, e verificaram a importância da goma xantana no processo de liberação da droga.

Embora os filmes de desintegração oral sejam bastante estudados quanto à incorporação de compostos sintéticos, os estudos relacionados aos filmes de desintegração oral incorporados com produtos naturais são bastante reduzidos. Alguns exemplos são apresentados a seguir.

Watanabe et al. (2009) desenvolveram e avaliaram a capacidade cicatrizante de filmes de desintegração oral à base de quitosana e alginato de sódio, contendo extrato da raiz de ginseng vermelho. Os resultados *in vivo*, utilizando hamsters, mostraram a boa capacidade de cicatrização dos filmes e a possibilidade de uso dos mesmos para o tratamento de mucosites ocasionadas por quimioterapia.

Daud, Sapkal e Bonde (2011) produziram filmes à base de hidroxipropilmetil celulose, maltodextrina, pululana e álcool polivinílico, incorporados com extrato de gengibre (*Zingiber officinale*), e verificaram a boa aceitação sensorial dos mesmos e a eficiência no tratamento de sintomas como náusea e enjôo.

Logo, considerando os estudos citados e o desenvolvimento de novas tecnologias, como inibidores de enzimas, potencializadores de permeabilidade e vetores de liberação de drogas, espera-se que a lista de fármacos que possam ser liberados de modo seguro e eficiente na mucosa oral possa aumentar. Isso poderia favorecer o tratamento de muitas doenças da mucosa oral, mas também permitir a administração sistêmica de drogas, que atualmente requer administração parenteral para melhor aceitabilidade do paciente (HEARNDEN, 2012).

2.1.2. Patentes e marcas comerciais

A seguir são apresentados alguns exemplos de patentes referentes aos filmes de desintegração oral, incorporados com diferentes princípios ativos e aplicações farmacológicas diversas.

Arbit e Goldberg (US 2013/ 052234-A1) produziram um filme de desintegração oral à base de hidroxipropilmetil celulose, pululana e maltodextrina, incorporados com cafeína, vitaminas (E, B5, B6, B12), visando seu uso como suplemento alimentar.

Breitenbach e Schwier (WO 2012/ 110222-A1) desenvolveram um filme de desintegração oral rápida (álcool polivinílico, polietileno glicol e plastificantes) contendo olanzapine, fármaco utilizado para o tratamento de distúrbios psicóticos como a esquizofrenia e transtorno bipolar. Os autores observaram que a droga mostrou-se mais estável do que em outras formas convencionais de dosagem.

Constantini (US 2011/ 237563-A1) desenvolveu um filme de desintegração oral rápida à base de amido de arroz, álcool polivinílico, e glicerol, contendo com princípio ativo ondansetron, para o tratamento de neuropatias, como Alzheimer, Parkinson e epilepsia, ou doenças pulmonares, principalmente para o tratamento de crianças e idosos.

Myers e Madhu (US 2011/ 160264-A1) produziram um filme de desintegração oral com as macromoléculas metil celulose e hidroximetil celulose, incorporado com ondansetron, para o tratamento e prevenção de náusea e vômito em pacientes submetidos à quimioterapia e radioterapia.

Riker et al. (US 2004/ 180077-A1) desenvolveram um filme de desintegração oral com o objetivo de redução do apetite, aumento da energia, aceleração do metabolismo e

redução do peso corporal. Os filmes foram formulados com amido de milho modificado, como macromolécula, e incorporados com cafeína, extrato de chá verde e ginseng.

Em relação ao uso comercial deste tipo de dosagem farmacêutica (uso oral ou não), na Tabela 1 são apresentados alguns filmes contendo diferentes princípios ativos, suas aplicações e as respectivas empresas fabricantes.

Tabela 1. Exemplos de filmes de desintegração oral comercializados contendo diferentes princípios ativos.

Produto	Empresa	Princípio Ativo	Aplicação
Chloraseptic relief strips	Zengen	Benzocaína	Anestésico local
Cough suppressant strips	Innozen	Dextrometorfano	Resfriado/Alergia
Cough suppressant herbal strips	Innozen	Mentol	Refrescante bucal
Little colds sore throat strips	Prestige brands	Ácido ascórbico, pectina	Resfriado/alergia
Ronflux	Bioprogress	Não divulgado	Ronco
Triaminic	Novartis	Dextrometorfano	Resfriado/alergia
Theraflu	Novartis	Difenidramina HCl	Supressor da tosse
Spiderman	Aquafilm	Vitamina	Suplemento vitamínico
Sudafed	Pfizer	Fenilefrina	Descongestionante nasal
Listerine pocketpak	Pfizer	Mentol	Refrescante bucal
Orafilm	Apothecus	Benzocaína	Alívio da dor

(Fonte: MISHRA; AMIM et al., 2007)

2.2. Macromoléculas

Dentre os vários polímeros disponíveis, pululana, gelatina e hidroxipropilmetil celulose são os mais comumente utilizados na preparação dos filmes de desintegração oral (DIXIT; PUTHLI, 2009; MORALES; MCCONVILLE, 2011). Amidos modificados também estão entre as macromoléculas usadas, principalmente devido ao baixo custo (DIXIT; PUTHLI, 2009). Na maioria das formulações, a mistura de diferentes polímeros é realizada com o intuito de se melhorar propriedades como hidrofiliabilidade, flexibilidade, sensação na boca e solubilidade (DIXIT; PUTHLI, 2009). A seguir estão citadas as características físicas e químicas, assim como as propriedades tecnológicas e de utilização como excipiente farmacêutico, das macromoléculas de interesse neste trabalho.

2.2.1. *Amido*

As características físicas e químicas do amido, além de seus aspectos nutricionais, o destacam dos demais carboidratos. É a reserva alimentar predominante das plantas, ocorrendo principalmente em semente, tubérculos, rizomas e bulbos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Pelo fato de ser facilmente hidrolisado e digerido, é um dos alimentos mais importantes da nutrição humana, fornecendo de 70 a 80% das calorias de consumo humano no mundo (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). O amido e os amidos modificados apresentam numerosas aplicações na indústria alimentícia, incluindo a promoção de adesão e a função de ligante, turbidez, filmes de recobrimento, gelificante, vitrificante,

retenção de umidade, estabilizante, texturizante e espessante (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

É constituído por uma mistura de dois polissacarídeos denominados amilose e amilopectina, em proporções que variam entre os amidos procedentes de diferentes espécies vegetais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; THOMAS; ATWELL, 1999). A amilose (Figura 1) é um polissacarídeo linear formado por unidades de D-glucopiranoses unidas entre si por ligações glicosídicas α (1-4), em número que variam de 200 a 10000. As ligações glicosídicas na configuração α conferem à amilose uma estrutura helicoidal (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; THOMAS; ATWELL, 1999).

Figura 1. Fórmula estrutural da amilose (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

A amilopectina (Figura 2) constitui a fração altamente ramificada do amido, sendo formada por várias cadeias constituídas de 20 a 25 unidades de α -D-glucopiranosose unidas em (1 – 4), que, por sua vez, estão unidas entre si por ligações α (1 – 6), representando de 4 a 6% do total das ligações glicosídicas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; THOMAS; ATWELL, 1999).

Figura 2. Fórmula estrutural da amilopectina (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Em relação à solubilidade, o amido é praticamente insolúvel em água fria, etanol e solventes orgânicos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). É considerado com um material não tóxico e não irritante (DIXIT; PUTHLI, 2009), listado como grau alimentício (GRAS) e incluso no guia de ingredientes inativos do FDA (FOOD and DRUG ADMINISTRATION, 2006).

Além de suas inúmeras aplicações na indústria alimentícia, o amido é também considerado um excipiente farmacêutico sendo amplamente utilizado nas formas farmacêuticas sólidas orais (cápsulas, comprimidos, sachês) como aglutinante, diluente e desintegrante (DIXIT; PUTHLI, 2009; SASSONE, 2012). Também é utilizado extensivamente em formulações de uso tópico como pós e pomadas (DIXIT; PUTHLI, 2009; SASSONE, 2012), além de sua utilização em cosméticos como condicionadores, cremes e loções para a pele, gel pós barba maquiagem em pó, sais de banho entre outros produtos (BATISTUZZO et al., 2006).

A diferença de composição do amido em relação à concentração de amilose e amilopectina altera as propriedades físicas deste excipiente, o que significa que os diferentes tipos de amidos apresentam utilização farmacêutica específica (PIFFERI et al., 1999). As características de compressibilidade e fluidez, bem como diluente, ligante e propriedades desagregadoras deste excipiente têm sido melhoradas pelos fabricantes ao longo dos anos, em conformidade com o desempenho requerido, por meio de uma série de modificações físicas e ou químicas do produto natural, tais como pré-gelatinização e reticulação (PIFFERI et al., 1999).

Entre os amidos modificados, que adquiriram elevada importância como excipientes ao longo dos últimos anos, existe o amido parcial ou totalmente pré-gelatinizado (PIFFERI et al., 1999; SASSONE, 2012). Estes são obtidos através da submissão do amido a um tratamento químico e ou mecânico com água e secagem sucessiva, proporcionando a abertura total ou parcial dos grãos (PIFFERI et al., 1999). Quando aquecido em meio aquoso, a ordem molecular no interior do amido muda, ou seja, os grãos homogêneos e esféricos do produto natural são transformados em partículas muito irregulares no produto gelatinizado. Este produto é amorfo e, quando colocado em água, tem a vantagem de se dissolver ou dispersar em função da concentração, mesmo à temperatura ambiente. O amido pré-gelatinizado encontra-se incluído nas principais farmacopeias (PIFFERI et al., 1999). Na indústria farmacêutica são encontrados exemplos de amidos pré-gelatinizados utilizados com excipientes. O SuperStarch®200 é um amido de milho parcialmente pré-gelatinizado utilizado em formulações de comprimidos de compressão direta, bem como em formulações de granulação úmida e de cápsula (DFE PHARMA, 2012). O Starch 1500® é um amido de milho também parcialmente pré-gelatinizado, que apresenta propriedades de ligante e desintegrante, sendo utilizado em dosagens orais sólidas (COLORCON, 2013).

Amidos modificados são usados para o revestimento de formas farmacêuticas de liberação imediata e podem também ser utilizados para a produção de filmes de desintegração oral em combinação com outras macromoléculas, o que se torna vantajoso devido ao seu baixo custo (DIXIT; PUTHLI, 2009). Diferentes amidos modificados têm sido utilizados em combinação com outros biopolímeros em estudos de liberação oral de drogas (ASSAAD et al., 2011; BROUILLET; BATAILLE; CARTILIER, 2008; TUOVINEN; PELTONEN; JÄRVINEN, 2003).

2.2.2. *Hidroxipropilmetil celulose (HPMC)*

Hidroxipropil metilcelulose (HPMC) é um éter semi-sintético derivado de celulose, que consiste de uma cadeia de celulose com grupos metoxílicos (OCH_3) e hidroxipropoxílicos ($\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_3$) substituídos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; FU et al., 2004). Comercialmente, a HPMC aprovada para uso farmacêutico está disponível em diferentes viscosidades e graus de substituição (NOVAK et al., 2012). A estrutura química da HPMC é ilustrada na Figura 3, onde o substituinte R representa o grupo $-\text{CH}_3$ ou $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$, ou um átomo de hidrogênio (SIEPMANN; PEPPAS, 2012). As propriedades físico-químicas deste polímero são fortemente afetadas pelo conteúdo dos grupos metoxi e hidroxipropoxil, e por seu peso molecular (SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

Figura 3. Estrutura química da HPMC (Fonte: SIEPMANN; PEPPAS, 2012).

É um dos polímeros mais frequentemente utilizado para a preparação de matrizes hidrofílicas utilizadas para a liberação prolongada de princípios ativos farmacêuticos, devido à sua natureza não tóxica, facilidade de compactação, e capacidade de acomodação de altas concentrações do fármaco (FU et al.; 2004; VIRIDEN; WITTGREN; LARSSON, 2009).

A hidroxipropilmetil celulose é amplamente utilizada em formulações de uso oral, oftálmico e tópico (FERREIRA, 2002). É principalmente usada como aglutinante em comprimidos, como filme de revestimento, agente formador de filme e como matriz para uso em formulações de liberação prolongada (TIWARI et al., 2013; FERREIRA, 2002). Também é utilizada como espessante, emulsificante e estabilizante em géis e pomadas, na manufatura de cápsulas, como adesivo em curativos plásticos e como agente umectante em lentes de contato (DIXIT; PUTHLI, 2009; FERREIRA, 2002).

Quanto à habilidade da hidroxipropilmetil celulose em formar filmes, diferentes exemplos são encontrados. Peh e Wong (1999) verificaram a possibilidade de produção de filmes à base de HPMC como veículo para liberação oral de fármacos. Semalty, Semalty e Kumar (2008) também verificaram que formulações contendo HPMC mostraram-se

adequadas para o desenvolvimento de filmes de dissolução oral para uso terapêutico. Segundo Garsuch e Breitzkreutz (2010), hidroxipropilmetil celulose foi o polímero mais adequado para a produção de filmes de desintegração oral, promovendo rápida desintegração, além dos mesmos se apresentarem de fácil manipulação e não adesivos.

2.3. Plantas medicinais

O uso de plantas, de suas partes e de compostos fitoquímicos isolados para a prevenção e o tratamento de várias doenças tem sido constantemente praticado pela humanidade. Aproximadamente 25% das drogas prescritas em todo mundo são derivadas de plantas e centenas de seus compostos ativos estão em uso (RATES, 2001). No Brasil, a utilização popular de plantas se dá principalmente na forma de tinturas, xaropes, chás, extratos fluidos e secos, sendo usualmente baseada no conhecimento empírico de suas propriedades, transmitidas oralmente de geração a geração, sem qualquer comprovação científica (SIQUEIRA, 2010).

Entre as plantas encontradas no Brasil e que são tanto utilizadas na medicina popular, quanto estudadas cientificamente por suas propriedades farmacológicas, pode-se citar a erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e a cúrcuma (*Curcuma longa*), que se destacam por suas propriedades antioxidante e anti-inflamatória. A erva baleeira foi a planta utilizada no desenvolvimento do primeiro fitoterápico inteiramente brasileiro, produzido pela maior empresa farmacêutica nacional, a Aché (SUGIMOTO, 2005). Trata-se de um anti-inflamatório de uso tópico, o que reforça a possibilidade de uso desta planta como anti-inflamatório natural. A cúrcuma, por sua vez é amplamente utilizada na culinária, nacional e internacional, sendo conhecida no Brasil como açafrão da terra. No entanto, devido aos

benefícios à saúde associados ao seu consumo, tornou-se amplamente estudada pela comunidade científica. Logo, a erva baleeira e a cúrcuma são as plantas selecionadas para a realização deste trabalho, cuja caracterização química e propriedades funcionais são descritas a seguir.

2.3.1. Erva baleeira (*Cordia verbenacea*)

Cordia verbenacea DC (Boraginaceae) é uma planta arbustiva e perene encontrada ao longo da costa brasileira, do Amazonas ao Rio Grande do Sul (AKISUE et al., 1983; PANIZZA, 1997). As partes aéreas desta planta, conhecida popularmente como erva baleeira, têm um cheiro muito forte e persistente, sendo utilizadas na medicina popular desde os tempos coloniais por suas propriedades antirreumáticas, anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante, na forma de extratos alcoólicos, decocções e infusões (AKISUE e tal., 1983). Na Figura 4 podem ser observadas as partes aéreas da erva baleeira (*Cordia verbenacea*).

Figura 4. Erva baleeira - *Cordia verbenacea* (Fonte: FLORIEN, 2014).

A caracterização fitoquímica dessa espécie mostrou a presença de flavonóides (quercetina, artemetina e hidroxiartemetina), mucilagens, taninos e óleos essenciais (JORGE et al., 1998; SERTIÉ et al., 1990). Carvalho et al (2004) identificaram α -pineno, trans-cariofileno e aloaromadendreno como os principais constituintes do óleo essencial extraído das partes aéreas de *Cordia verbenacea*.

Quanto às suas propriedades farmacológicas, Sertié et al. (1988, 1991) verificaram significativa atividade anti-inflamatória para o extrato de folhas de *Cordia verbenacea*, além de um efeito protetor sobre a mucosa gástrica e baixa toxicidade. Sertié et al. (2005) também verificaram a atividade anti-inflamatória de *Cordia verbenacea* administrada por via tópica e oral, sendo esta última comparada aos anti-inflamatórios comerciais nimesulida e dexametasona. De acordo com Sertié et al. (1990) esta atividade deve-se ao flavonóide artemetina que inibiu significativamente o edema de pata induzido por carragenina em ratos, e demonstrou também toxicidade muito baixa.

Fernandes et al. (2007) e Medeiros et al. (2007) verificaram a atividade anti-inflamatória dos compostos α -humuleno e trans-cariofileno provenientes do óleo essencial de *Cordia verbenacea*. Segundo Passos et al. (2007), o óleo essencial de *Cordia verbenacea* e alguns de seus compostos ativos também mostraram atividade anti-inflamatória *in vivo*, o que, de acordo com estes autores, demonstra que esta planta ou seus constituintes podem representar novas opções terapêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias.

Extratos de *Cordia verbenacea* são também relatados como importantes fontes de compostos bioativos com atividade antioxidante (MICHIELIN et al, 2011) e com forte atividade antibacteriana (MICHIELIN et al., 2009).

Oliveira et al. (2011) verificaram que o extrato de *Cordia verbenacea* inibiu a secreção de histamina em mastócitos de diferentes espécies animais *in vitro*, e em mastócitos de animais tratados com o extrato, o que mostra tanto o efeito anti-inflamatório quanto

antialérgico da planta. Parisotto et al. (2012) observaram que o extrato de *Cordia verbenacea* produzido por extração com fluido supercrítico exibiu atividade antitumoral, que foi associada à inibição da enzima COX-2.

Como a atividade anti-inflamatória do extrato erva baleeira (*Cordia verbenacea*), segundo Sertié et al. (1990), está associada aos flavonóides presentes no mesmo, segue uma descrição das principais atividades biológicas associadas a esta classe de compostos químicos.

2.3.1.1. Flavonóides

Os flavonóides são membros de uma classe de compostos naturais que têm sido objeto de considerável interesse científico e terapêutico, tanto pela indústria farmacêutica na pesquisa de novas ervas medicinais e, conseqüentemente, de compostos funcionais que possam servir para o desenvolvimento de novos medicamentos, mas também pela ênfase dada aos efeitos benéficos à saúde de tratamentos à base de produtos naturais (HAVSTEEN, 2002).

São uma subclasse dos polifenóis e quimicamente estes compostos apresentam uma estrutura comum, o difenilpropano (C6-C3-C6), que consiste de dois anéis aromáticos ligados através de três carbonos que usualmente formam um heterociclo oxigenado, conforme apresentado na Figura 5 (BEECHER, 2003, RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006).

Estão presentes em frutas comestíveis, vegetais folhosos, raízes, tubérculos, bulbos, ervas, temperos, legumes, chá, café e vinho tinto (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Podem ser classificados em sete grupos: flavonas, flavanonas, flavonolóis, isoflavonas, flavanóis (catequinas) e antocianinas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). As fórmulas estruturais de alguns desses flavonóides são mostradas na Figura 6.

Figura 5. Fórmula estrutural básica dos flavonóides (Fonte: RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006).

Quase todos os flavonóides possuem várias características biológicas e químicas em comum como atividade antioxidante, capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio, capacidade de sequestrar eletrófilos, capacidade de inibir a nitrosação, capacidade de quelar metais (Fe e Cu), e capacidade de modular a atividade de algumas enzimas celulares (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Aparentemente dietas ricas em flavonóides podem proteger contra doenças cardiovasculares, distúrbios neurodegenerativos e alguns tipos de câncer (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 6. Fórmula estrutural de alguns flavonóides (Fonte: BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008)

A maioria dos efeitos benéficos dos flavonóides à saúde é atribuída à sua capacidade antioxidante, destacando-os como importantes na prevenção de doenças associadas com o dano oxidativo de membranas, proteínas e DNA (FERGUSON, 2001).

Quanto à diminuição do risco de doenças cardiovasculares, por exemplo, acredita-se que os flavonóides atuem através de três ações principais: melhora da vasodilatação coronariana, diminuição da agregação plaquetária e prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008).

Em relação às suas propriedades anticarcinogênicas, os flavonóides podem atuar nas diferentes fases de desenvolvimento dos tumores: protegendo o DNA contra danos oxidativos, inativação da carcinogênese, inibição da expressão de genes mutagênicos e de enzimas

responsáveis pela ativação de substâncias carcinogênicas e ativação de sistemas de desintoxicação (BRAVO, 1998).

Outra importante atividade atribuída aos flavonóides é a capacidade anti-inflamatória que tem sido relacionada à atividade antioxidante através do sequestro de radicais, à regulação da atividade de células relacionadas ao processo inflamatório, à modulação do metabolismo do ácido araquidônico, à modulação da produção e expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias (BENAVENTE-GARCÍA; CASTILLO, 2008; GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009). Além do que, os processos inflamatórios parecem, cada vez mais, ser relacionados ao desenvolvimento de várias doenças crônicas como arteriosclerose, obesidade, diabetes, doenças neurodegenerativas e até mesmo câncer (GARCÍA-LAFUENTE et al., 2009), o que ressalta a importância destas substâncias na dieta.

Diferentes estudos tem demonstrado as propriedades farmacológicas dos flavonóides quanto aos seus efeitos antioxidantes (LUO et al., 2014; SADOWSKA-BARTOSZ et al., 2014; WU et al., 2015), cardiovasculares (STOCKER; O'HALLORAN, 2004, TIAN et al., 2014; VITOR et al., 2004, XU et al., 2007), anticarcinogênicos (ZHANG et al., 2005; KUNTZ; WENZEL; DANIEL, 1999; SHARMA et al., 2009) e anti-inflamatórios (HOUGEE et al., 2005; RATHEE et al., 2009; ROTELLI et al., 2003; WANG et al., 2006).

2.3.2. *Cúrcuma (Curcuma longa)*

Cúrcuma é o pó seco produzido do rizoma de *Curcuma longa* (Figura 7), uma erva perene pertencente à família Zingiberaceae, que é encontrada no sul e sudeste asiático (AMMON; WAHL, 1991). É amplamente utilizada como especiaria na culinária doméstica, e

também em produtos têxteis, farmacêuticos, de confeitaria e cosmético (AGGARWAL et al., 2007; AMMON, WAHL, 1991; SINGH et al., 2003).

Figura 7. Rizoma de *Curcuma longa* e a cúrcuma em pó (OFICINA DE ERVAS, 2014).

A *Curcuma longa* tem sido utilizada na medicina tradicional asiática como um tônico estomacal e purificador do sangue, e também para o tratamento de doenças do fígado, da pele e cicatrização de feridas (HABIBOALLAH et al., 2008; SINGH et al., 2010). Entre as ervas, classificadas como especiarias, a cúrcuma é uma das mais pesquisadas devido às suas propriedades farmacológicas (HABIBOALLAH et al., 2008), sendo considerada potencialmente benéfica para o tratamento ou redução de sintomas associados a uma ampla variedade de problemas de saúde, devido a suas propriedades antimicrobiana, anti-tumoral, anti-inflamatória e antioxidante (ANAND et al., 2008; HABIBOALLAH et al., 2008).

Diferentes estudos têm demonstrado as propriedades terapêuticas da cúrcuma. Ramsewak et al. (2000) verificaram a toxicidade da curcumina contra células de vários tipos

de câncer (leucemia, cólon, melanoma, renal e mama), inibição da peroxidação lipídica e das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2).

Li et al. (2002) verificaram que curcumina inibiu a carcinogênese oral, sendo que esta capacidade foi relacionada à supressão da proliferação celular, indução de apoptose e inibição da angiogênese. Este resultado sugere que esta substância poderia ser utilizada como um agente quimiopreventivo em pessoas com alto risco de câncer oral.

Mohanty et al. (2004) avaliaram o efeito cardioprotetor da administração oral do extrato aquoso de *Curcuma longa* (100 mg/kg) em ratos, cujos benefícios foram associados à supressão do estresse oxidativo e melhora da função ventricular. Os exames histopatológicos confirmaram os efeitos protetores da cúrcuma sobre o coração.

Nishiyama et al. (2005) identificaram a presença de curcuminóides e sesquiterpenóides no extrato etanólico de cúrcuma, que apresentou forte efeito hipoglicêmico. Xia et al., 2006 verificaram a atividade antidepressiva do extrato etanólico de cúrcuma administrado em ratos, o que demonstra uma possibilidade de estudo para o tratamento de humanos.

Adaramoye et al. (2009) demonstraram o efeito hipotensor e bradicárdico do extrato metanólico de *Curcuma longa* em ratos, além da capacidade de vasodilatação das artérias mesentéricas.

Sadzuka et al., 2012 avaliaram o efeito da curcumina sobre a atividade de doxorubicina (DOX), uma droga utilizada para o tratamento de vários tipos de câncer. Estes autores verificaram um aumento da atividade anti-tumoral da DOX e redução de reações adversas associadas a ela, o que poderia representar uma melhoria no tratamento clínico do câncer e na qualidade de vida dos pacientes. Dao et al. (2012) observaram que os curcuminóides de *Curcuma longa* podem atuar como importantes moléculas complementares na prevenção e tratamento de doenças causadas por vírus influenza.

Karaman et al. (2012) demonstraram os efeitos anti-inflamatórios da curcumina sobre a asma crônica em ratos, principalmente em relação à diminuição das mudanças histopatológicas ocasionadas por esta patologia. Kloesch et al. (2013) estudaram a capacidade anti-inflamatória e efeitos apoptóticos da curcumina sobre células derivadas de pacientes com artrite reumatóide, cujos resultados indicaram a possibilidade de utilização desta substância, como um medicamento natural, para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide.

A cúrcuma apresenta três importantes compostos análogos, a curcumina, a demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, que em conjunto são chamados de curcuminóides (ANAND et al., 2008). Muitos pesquisadores têm provado que a maioria das atividades associadas com a cúrcuma se deve à curcumina (BALAJI; CHEMPAKAM, 2010). Os curcuminóides são descritos a seguir.

2.3.2.1. Curcuminóides

Os curcuminóides, que se referem a um grupo de compostos fenólicos presentes no rizoma, correspondem de 1 a 5% da cúrcuma e são responsáveis pela coloração amarela e por suas propriedades farmacológicas (GILDA et al., 2010; NISHIYAMA et al., 2005; RUBY et al., 1995; SENGUPTA; SHARMA; CHAKRABORTY, 2011). A cúrcuma disponível comercialmente consiste de uma mistura dos compostos curcumina (75 - 80%), demetoxicurcumina (15% - 20%) e bisdemetoxicurcumina (3 - 5%), que quimicamente diferem entre si pela substituição do grupamento metoxi ($\text{CH}_3\text{O}-$) sobre o anel aromático (AGGARWAL et al., 2007; ANAND et al., 2008; CHATOOPADHYAY et al. 2004). As estruturas químicas dos principais curcuminóides são apresentadas na Figura 8.

Figura 8. Estrutura química dos curcuminóides: (A) curcumina, (B) demetoxicurcumina, (C) bisdemetoxicurcumina (Fonte: KIM et al., 2001).

Os curcuminóides têm a capacidade de sequestrar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila, peroxila e ânions superóxido, que estão relacionadas ao estresse oxidativo e têm um papel fundamental nos processos inflamatórios, doenças do coração e câncer (ANAND et al., 2008; PULLA REDDY, LOKESH, 1994; JAYAPRAKASHA et al., 2005). A atividade antioxidante destas substâncias tem sido amplamente estudada (JAYAPRAKASHA et al., 2006; AK, GÜLÇİN, 2008; SOMPARN et al., 2007).

Diferentes mecanismos anti-inflamatórios têm sido relacionados aos curcuminóides, como a inibição de várias moléculas inflamatórias como a fosfolipase, lipoxigenase, cicloxigenase-2, leucotrienos, tromboxanos, prostaglandinas, óxido nítrico, citocinas inflamatórias (TNF- α , interleucinas), entre outras (AGGARWAL et al., 2003; LANTZ et al., 2005; ULBRICHT et al., 2011; SHISHODIA et al., 2013). Também apresentam efeitos imunomodulatórios e atuam sobre a angiogênese e adesão celular (SHARMA et al., 2005; THOMAS-EAPEN, 2009).

Em várias doenças crônicas, em que a inflamação tem um importante papel, como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, epilepsia, câncer, asma, artrite reumatóide, a curcumina tem exibido potencial terapêutico (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009).

Quanto à sua segurança e toxicidade, a cúrcuma é considerada um alimento seguro (GRAS) pelo FDA, para uso como corante e aromatizante em alimentos. Tem sido considerada relativamente inerte e não tóxica a animais e humanos, mesmo quando administrada em doses elevadas (SHANKAR et al., 1980; SONI, KUTTAN, 1992). Um estudo realizado no Nepal mostrou que o consumo de 1,5 g de cúrcuma/por pessoa/por dia, equivalente a aproximadamente 50 mg/dia de curcumina, não parece estar associado com efeitos adversos em humanos (EIGNER; SCHOLZ, 1999). Na Índia, onde o consumo médio de cúrcuma pode variar entre 2,0 e 2,5 g/dia (cerca de 60-100 mg/dia de curcumina), nenhuma toxicidade ou efeitos adversos tem sido verificado na população (CHAINANI-WU, 2003). Dadhaniya et al. (2011) verificaram, em estudos de toxicidade, que a administração oral de curcumina na dose 720 mg/kg/dia não provocou nenhum efeito adverso em fêmeas e machos de ratos. Considerando uma pessoa de 60 kg, a dose equivalente seria de 40g/dia.

É importante destacar que, embora a cúrcuma e a curcumina sejam produtos naturais já consumidos através da alimentação, as doses administradas em estudos clínicos excedem aquelas normalmente consumidas na dieta, o que reforça a necessidade de estudos sobre segurança e toxicidade (STRIMPAKOS; SHARMA, 2008).

3. OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi produzir e caracterizar os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*), visando o estudo das capacidades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória dos mesmos.

3.1. Objetivos específicos

- Desenvolver uma formulação de filme de desintegração oral rápida a partir das macromoléculas amido pré-gelatinizado e hidroxipropilmetil celulose (HPMC), contendo sorbitol como plastificante.
- Caracterizar os extratos vegetais quanto ao teor de flavonóides para o extrato de erva baleeira e de curcuminóides para o extrato de cúrcuma, por métodos espectrofotométricos.
- Caracterizar os filmes de desintegração oral sem extrato: aspectos visuais, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), propriedades mecânicas, mucoadesividade, tempo de desintegração *in vitro* e desintegração *in vivo*.
- Produzir e caracterizar os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*).

- Determinar as propriedades funcionais dos extratos de erva baleeira e cúrcuma, e dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos vegetais: atividades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória.
- Estudar a estabilidade de flavonóides e curcuminóides nos extratos e nos filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma, em função do tempo e das condições de armazenamento.
- Avaliar sensorialmente a aceitação dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

Os filmes de desintegração oral foram preparados com as macromoléculas amido pré-gelatinizado (Amidomax 3600, Cargill Agrícola S/A) e hidroxipropilmetil celulose (E15, Colorcon do Brasil LTDA) e sorbitol (Vetec) como plastificante. Os extratos vegetais foram produzidos com as plantas erva baleeira (Florien, Piracicaba - SP), e cúrcuma (Oficina de Ervas, Ribeirão Preto - SP), utilizando álcool etílico (Synth) como solvente. Foram utilizados os reagentes: quercetina (Sigma-Aldrich), curcumina (Merck), ácido gálico (Sigma-Aldrich), trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, Sigma-Aldrich), DPPH (2,2-diferyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich), Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich), nitrato de alumínio (Synth), acetato de potássio (Synth), carbonato de sódio (Synth), TPTZ (2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine, Sigma-Aldrich), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Na análise microbiológica utilizou-se caldo BHI (Himedia), ágar nutriente (Himedia), ágar sabouraud (Merck), o antibiótico cloranfenicol e os microrganismos *Streptococcus mutans* (ATCC 25175/ CCT 3440) e *Candida albicans* (ATCC 10231/ CCT 0776) doados pela Fundação André Toselo (Campinas – SP).

A análise de atividade anti-inflamatória foi realizada através de um kit de inibição de ciclooxigenase (Cayman Chemical), e o anti-inflamatório dexametasona foi utilizado como padrão de referência.

4.2. Produção e caracterização dos extratos de erva baleeira e cúrcuma

4.2.1. Extração

Inicialmente foi realizado um estudo das condições de produção dos extratos de erva baleeira e cúrcuma, visando otimizar as concentrações de flavonóides e curcuminóides. Foram avaliadas três relações de massa de planta/ volume de solvente: 10 g de planta/ 100 mL solvente, 15 g de planta/ 100 mL de solvente e 20 g de planta/ 100 mL de solvente. A máxima relação entre massa de planta/ volume de solvente realizada neste estudo foi limitada pela massa de erva baleeira/ 100 mL de solvente, cuja maior massa possível de mistura com o solvente foi de 20 g da planta em pó. Maiores valores de massa da planta produziram uma mistura pastosa e impossível de extração.

Para a produção do extrato de erva baleeira foram utilizados as folhas e talos da planta em pó. Para o extrato de cúrcuma, utilizaram-se os rizomas em pó. O solvente utilizado foi o álcool etílico hidratado (80%). A extração foi realizada em um banho termostático à temperatura de 50°C, durante 1 h, sob agitação mecânica constante (RW20 - IKA, 500 rpm). Os extratos de erva baleeira e cúrcuma obtidos foram quantificados, respectivamente, quanto ao teor de flavonóides e curcuminóides.

4.2.2. Determinação da concentração de flavonóides e curcuminóides

4.2.2.1. Determinação da concentração de flavonóides no extrato de erva baleeira

Os extratos de erva baleeira foram analisados espectrofotometricamente quanto ao teor de flavonóides totais, de acordo com Park et al. (1995), utilizando quercetina como padrão. Para a análise, os extratos de erva baleeira foram diluídos com álcool etílico (80%) na proporção de 1:10, obtendo-se a concentração de 0,1 mL de extrato/ mL de solução. Neste método, a quantificação de flavonóides é realizada em duas etapas: uma reação com nitrato de alumínio e uma reação sem nitrato de alumínio. Na reação com nitrato de alumínio, uma alíquota dos extratos previamente diluídos (0,5 mL) foi misturada a 4,3 mL de álcool etílico 80%, 0,1 mL de acetato de potássio (1 mol/L) e 0,1 mL de nitrato de alumínio (10%). Na reação sem nitrato de alumínio, a alíquota dos extratos diluídos (0,5 mL) foi misturada a 4,4 mL de álcool etílico 80% e 0,1 mL de acetato de potássio (1 mol/L). O branco foi preparado com 4,9 mL de álcool etílico 80% e 0,1 mL de acetato de potássio. Após 40 minutos, a absorbância das soluções, com e sem nitrato de alumínio, foi determinada em um espectrofotômetro (SP 22, Biospectro) a 415 nm. A absorbância final das amostras foi determinada calculando-se a variação entre as absorbâncias com e sem nitrato (absorbância final = absorbância com nitrato – absorbância sem nitrato). Os resultados foram expressos em mg eq. de quercetina/ mL de extrato.

4.2.2.2. Determinação da concentração de curcuminóides no extrato de cúrcuma

Os extratos de cúrcuma foram avaliados espectrofotometricamente quanto ao teor de curcuminóides, de acordo Kumar et al. (2010), utilizando a curcumina como padrão. Os extratos foram diluídos inicialmente na proporção de 0,1 mL de extrato/ 100 mL de álcool etílico absoluto (solução A), e em seguida 1 mL da solução A foi diluída em 10 mL de álcool etílico absoluto, obtendo-se a concentração de 0,0001 mL de extrato/ mL de solução. A leitura foi realizada imediatamente em um espectrofotômetro (SP 22, Biospectro) no comprimento de onda de 427 nm. Os resultados foram expressos em mg eq. de curcumina/ mL de extrato.

4.2.3. Concentração dos extratos

Os extratos de erva baleeira e cúrcuma com as maiores concentrações de flavonóides e curcuminóides, respectivamente, foram concentrados com o objetivo de se aumentar o teor das substâncias de interesse. A concentração foi realizada sob vácuo em um evaporador rotativo (TE 211, Tecnal) à 40°C e 400 rpm de rotação. O extrato de erva baleeira foi concentrado à 50% de seu volume inicial ($V_{\text{final}} = 50\% V_{\text{inicial}}$), e o extrato de cúrcuma à 70% do volume inicial ($V_{\text{final}} = 70\% V_{\text{inicial}}$). Os extratos concentrados foram caracterizados novamente em relação ao teor de flavonóides e curcuminóides, e utilizados na preparação dos filmes de desintegração oral bioativos. A diferença na concentração entre os extratos de erva baleeira e cúrcuma foi estabelecida visando-se evitar qualquer insolubilização no extrato de cúrcuma, uma vez que o mesmo é muito hidrofóbico, mas altamente solúvel em álcool etílico.

4.3. Produção dos filmes de desintegração oral

4.3.1. *Filmes de desintegração oral sem extrato*

Os filmes de desintegração oral foram produzidos por *casting* com amido pré-gelatinizado e hidroxipropilmetil celulose, sendo a concentração de macromoléculas (amido + hidroxipropilmetil celulose) mantida em 2g/ 100g de solução filmogênica. O plastificante sorbitol foi utilizado na concentração de 20g/ 100g das macromoléculas, concentração considerada adequada para a formulação de filmes de desintegração oral. Na Tabela 2 são apresentadas as formulações dos filmes de desintegração oral produzidos.

Para a produção dos filmes, a solução de cada macromolécula foi preparada isoladamente conforme descrito a seguir. O amido pré-gelatinizado foi disperso em água (25°C) e mantido sob agitação constante por 30 minutos em um agitador magnético (Topolino, IKA). Em seguida, a dispersão foi aquecida à 80°C (20 minutos) e resfriada à 50°C sob agitação magnética. A hidroxipropilmetil celulose foi dispersa em água à 90°C (20 minutos) sob agitação magnética constante e resfriada até 50°C para obtenção de uma solução transparente. O plastificante sorbitol foi previamente solubilizado em água (25°C) e adicionado na solução de amido ou hidroxipropilmetil celulose sob agitação magnética constante, obtendo-se a solução filmogênica. Nas formulações dos filmes que utilizaram blendas de amido pré-gelatinizado e HPMC, as soluções das macromoléculas foram misturadas e homogeneizadas à 50°C, com posterior adição do plastificante.

Tabela 2. Formulação dos filmes de desintegração oral em função da concentração (g/ 100g de solução filmogênica) de amido pré-gelatinizado (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).

Relação (%)		A	HPMC
A:HPMC	(g/ 100g de solução filmogênica)	(g/ 100g de solução filmogênica)	
100:0		2,0	0
90:10		1,8	0,2
80:20		1,6	0,4
70:30		1,4	0,6
60:40		1,2	0,8
50:50		1,0	1,0
40:60		0,8	1,2
30:70		0,6	1,4
20:80		0,4	1,6
10:90		0,2	1,8
100:0		0	2,0

As soluções filmogênicas foram dispersas em placas de polietileno e secas em estufa com circulação de ar (MA 035, Marconi) a 30°C. A espessura dos filmes de desintegração oral foi fixada em $0,060 \pm 0,006$ mm, e determinada utilizando-se um micrômetro digital (resolução 0,001 mm, Mitutoyo) através de dez medidas aleatórias sobre a área dos filmes.

4.3.2. Filmes de desintegração oral incorporados com os extrato de erva baleeira e cúrcuma

A formulação do filme de desintegração oral selecionada, entre as analisadas (Tabela 2), foi utilizada para a produção dos filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e

cúrcuma. A seleção foi realizada em função dos resultados obtidos nas caracterizações dos filmes sem extrato.

Como o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes de desintegração oral (FDO) na forma de doses unitárias (6 cm^2), a concentração de cada extrato na solução filmogênica foi calculada para que em cada FDO a concentração do princípio ativo, flavonóides ou curcuminóides, estivesse nas concentrações de 0,25 mg, 0,50 mg e 0,75 mg. Estes valores foram baseados na concentração de substâncias anti-inflamatórias presentes em dosagens farmacêuticas sólidas, utilizando-se como referência os comprimidos à base de dexametasona, que apresentam, geralmente, a concentração de 0,50 mg/ comprimido.

Para a produção dos filmes, as macromoléculas e o plastificante foram preparados exatamente conforme descrito anteriormente para os filmes sem extrato. Para a incorporação dos extratos de erva baleeira ou cúrcuma, a solução filmogênica foi resfriada a 45°C , visando evitar a degradação térmica de flavonóides e curcuminóides. As soluções foram homogeneizadas adequadamente utilizando um agitador magnético (Topolino, IKA) e distribuídas em placas de polietileno (40g de solução/ placa). Os filmes foram secos a 30°C em estufa com circulação de ar (MA 035, Marconi).

4.4. Caracterização dos filmes de desintegração oral

4.4.1. Aspectos visuais

Os filmes de desintegração oral foram inicialmente avaliados quanto ao seu aspecto visual. Para os filmes sem extrato, a homogeneidade foi baseada na ausência de

irregularidades na superfície dos mesmos e de separação de fases entre as macromoléculas utilizadas em sua composição, evidenciada principalmente pela presença de áreas descontínuas e de diferença de coloração na matriz. Nos filmes produzidos com os extratos de erva baleeira e cúrcuma, foram avaliadas as possíveis alterações ocasionadas pela incorporação dos extratos na matriz polimérica.

4.4.2. Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura (superficial e interna) dos filmes foi analisada empregando-se um microscópio eletrônico de varredura (Hitachi, TM3000, Japan) acoplado a um analisador elementar EDS (Oxford Instrument, SwiftED 3000, UK) a 15kV. Anteriormente às análises, os filmes foram acondicionados em dessecador com sílica por um período de 7 dias. Para a análise da superfície, os filmes não foram submetidos a nenhum tratamento adicional. Para a análise da microestrutura interna, os filmes foram fraturados em nitrogênio líquido.

4.4.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para esta análise, realizada de acordo com Vicentini et al. (2005), os filmes foram acondicionados em dessecador com sílica por um período de 10 dias. Utilizou-se um espectrofotômetro Perkin Elmer (Spectrum One). Foram realizadas 16 varreduras na faixa

espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} . Os espectros de varredura foram coletados e analisados utilizando-se software adequado.

4.4.4. *Propriedades mecânicas*

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas através de testes de tração, utilizando-se um texturômetro TA.XT2 (TA Instruments), de acordo com a ASTM (D882-10). As amostras dos filmes (25,4 x 120 mm) foram fixadas em uma sonda específica (*tensile grips*), a distância inicial de separação foi fixada em 100 mm e a velocidade de realização do teste em 50 mm/min. A tensão na ruptura (T) e a porcentagem de alongação (E) foram obtidas diretamente das curvas de tensão *versus* alongação. O módulo elástico (ME) foi determinado calculando-se o coeficiente angular da parte linear da curva. Anteriormente aos testes, os filmes foram acondicionados em dessecadores contendo solução saturada de brometo de sódio (58% de umidade relativa), à temperatura (25°C), durante 5 dias. As caracterizações dos filmes foram realizadas em sala climatizada na temperatura de 25° C e umidade relativa na faixa de 55 a 65%.

4.4.5. *Mucoadesividade in vitro*

A análise de mucoadesividade foi realizada em um texturômetro TA.XT2 (TA Instruments), de acordo com Bruschi et al. (2007), utilizando-se pele de frango como modelo

de mucosa (PEH; WONG, 1999). Os filmes (4 x 4 cm) foram fixados na base do texturômetro e a pele de frango foi fixada no probe cilíndrico (diâmetro = 20 mm) e previamente hidratada por 20 segundos com uma solução tampão fosfato (pH = 6,8) a 37°C. Foi aplicada sobre a superfície do filme uma força de compressão constante de 0,1 N, durante 30 segundos, fixando-se a velocidade de separação em 1 mm/s. A mucoadesividade *in vitro* corresponde à força máxima (N) necessária para a separação entre o filme e a mucosa.

4.4.6. Tempo de desintegração *in vitro*

O tempo de desintegração *in vitro* foi realizado segundo Garsuch e Breitzkreutz (2010), visando simular as condições da cavidade oral. O filme (3 x 4 cm) foi fixado em um suporte (slide frame holding) e o mesmo, contendo o filme completamente esticado, foi colocado em uma placa de petri. Cerca de 200 µL de uma solução tampão fosfato (pH = 6,8) a 37°C foi adicionada sobre a superfície do filme e o tempo para que o mesmo fosse perfurado foi considerado.

4.4.7. Desintegração *in vivo*

A avaliação da desintegração *in vivo* dos filmes de desintegração oral foi realizada por provadores treinados, utilizando-se uma escala de intensidade não estruturada (9 cm). O projeto foi inicialmente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FZEA/USP, segundo

o processo CEP/CONEP (CAAE 16840613.0.0000.5422). Somente os filmes de desintegração oral sem extrato (Tabela 2) foram submetidos a esta análise, que foi utilizada como uma importante ferramenta na seleção da formulação mais adequada para a produção dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.

A análise as seguintes etapas: recrutamento e pré-seleção dos provadores, treinamento da equipe sensorial, seleção final dos provadores, avaliação das amostras e análise de resultados. Na etapa de recrutamento, foram convidadas pessoas que tivessem pré-disposição e interesse na análise deste tipo de produto. Todos os interessados (15 indivíduos) consentiram formalmente sobre a participação neste projeto de pesquisa através da assinatura do Termo de consentimento livre e esclarecido (Figura 9).

Termo de consentimento livre e esclarecido

Consentimento formal de participação no trabalho de pesquisa: "AVALIAÇÃO SENSORIAL DE FILMES DE DESINTEGRAÇÃO ORAL COMO VEICULO DE COMPOSTOS BIOATIVOS".

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

JUSTIFICATIVA: Filmes de desintegração oral são filmes ultrafinos produzidos partir de diferentes macromoléculas (amido, gelatina, hidroxipropilmetil celulose, entre outras) e apresentam várias vantagens em relação às formas convencionais de medicamentos, como facilidade de administração e não necessidade de água. Além disso, devido à mucosa oral ser altamente vascularizada, os princípios ativos incorporados nestes filmes podem entrar diretamente na circulação sistêmica, sem a passagem pelo metabolismo hepático. Esses filmes podem veicular não apenas compostos ativos sintéticos, mas também compostos ativos naturais com propriedades funcionais (antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória), principalmente devido à importância atual da utilização de extratos vegetais para a prevenção e tratamento de doenças.

OBJETIVOS: Este trabalho de pesquisa visou o desenvolvimento de filmes de desintegração oral com rápida desintegração, boa sensação na boca e que agradem aos consumidores.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Os provadores não terão qualquer tipo de **despesas em decorrência da participação nesta pesquisa.**
- **Não há possibilidade de risco ou qualquer tipo de desconto** em função da participação nesta pesquisa, uma vez que todos os ingredientes utilizados nos produtos são inteiramente seguros e serão de boa qualidade e procedência e o processo de fabricação será realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação.
- Em função do exposto no item anterior, não há **previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto.**
- Os testes para avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos **serão acompanhados** pela equipe de pesquisa.
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "AVALIAÇÃO SENSORIAL DE FILMES DE DESINTEGRAÇÃO ORAL COMO VEICULO DE COMPOSTOS BIOATIVOS". Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores. Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Pirassununga, ____ de _____ de 2013 Assinatura _____

Figura 9. Termo de consentimento livre e esclarecido de participação na avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral.

Na etapa de pré-seleção, os provadores analisaram sensorialmente um filme de desintegração oral comercial (Fresh), que é utilizado para refrescância bucal e um filme produzido à base de amido pré-gelatinizado e sorbitol (100A:0HPMC). O objetivo da análise foi apresentar este tipo de produto para todos os provadores, identificar pessoas não aptas para a análise deste tipo de produto e explicar os objetivos do estudo. Com o auxílio dos provadores selecionados, foi estabelecido um método padronizado para a experimentação dos filmes: beber um pouco de água, aguardar cerca de 10 s, colocar o filme sobre a língua, elevá-la ao palato superior, de modo que o filme ficasse aderido ao mesmo, realizar movimentos suaves com a língua sobre o filme até a completa desintegração do mesmo na cavidade oral. Como o atributo sensorial analisado foi a velocidade de desintegração dos filmes (rápida ou lenta), foram estabelecidos como padrões de referência de intensidade, filmes de desintegração rápida e lenta. Para o filme de desintegração rápida, foi selecionado o filme comercial que apresentou um tempo médio de desintegração de 20 s, e para o filme de desintegração lenta selecionou-se o filme à base de amido (100A:0HPMC), que apresentou um tempo médio de desintegração de 90 s.

Para o treinamento dos provadores foram utilizados, além do filme à base de amido, os filmes à base amido:gelatina (80A:20G) e amido:hidroxipropilmetil celulose (80A:20HPMC), que apresentam tempos de desintegração diferentes entre si. O filme comercial foi descartado do treinamento, pois é saborizado e contrastaria muito com os filmes produzidos neste estudo. Os filmes avaliados foram padronizados em relação ao tamanho (2 x 3 cm) e à espessura ($0,06 \pm 0,006$).

Inicialmente os provadores avaliaram a velocidade de desintegração dos filmes utilizando cronômetros e, quando houve reprodutibilidade destes resultados em relação às amostras e aos provadores, a escala de intensidade não estruturada (Figura 10) foi inserida nas análises. Quando foi verificado o bom poder discriminativo dos provadores em relação à

velocidade de desintegração dos filmes, resultados reprodutíveis, uso correto da escala de intensidade e consenso entre os membros da equipe, o treinamento foi finalizado e iniciou-se a seleção final dos provadores.

A seleção final foi realizada em cabines e utilizou-se a ficha de avaliação estabelecida durante o treinamento (Figura 10). Nesta etapa foram utilizados os filmes de amido:gelatina (80A:20G) e amido:hidroxipropilmetilcelulose (80A:20HPMC). As amostras dos filmes foram codificadas e aleatorizadas, e apresentadas em triplicata. Foram realizadas duas sessões nesta etapa.

Após o treinamento e seleção dos provadores, os filmes de desintegração oral sem extrato foram analisados sensorialmente quanto à velocidade de desintegração. As amostras de filmes foram codificadas, aleatorizadas e oferecidas em triplicata.

Nome: _____

Amostra: _____

Rápido Lento

Figura 10. Ficha de avaliação sensorial e a escala de intensidade utilizada na análise da desintegração dos filmes de desintegração oral sem extrato.

4.5. Quantificação de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral produzidos com os extratos de erva baleeira e cúrcuma

A quantificação da concentração de flavonóides nos filmes contendo o extrato de erva baleeira (0,25 mg, 0,50 mg e 0,75 mg de flavonóides/ FDO) foi determinada segundo Park et al. (1995). As amostras de cada filme (0,0500 g) foram solubilizadas em 10 mL de água destilada (50°C, 1h), e as soluções foram homogeneizadas em vortex para garantir a desintegração total dos filmes. Destas soluções foram retiradas as alíquotas de 0,5 mL utilizadas na análise de flavonóides, descrita anteriormente. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de quercetina/ FDO. A dose unitária do filme de desintegração oral (FDO) equivale a 0,0500 g de filme.

A determinação de curcuminóides nos filmes incorporados com o extrato de cúrcuma (0,25 mg, 0,50 mg e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO), foi realizada de acordo com Kumar et al. (2010). As amostras dos filmes (0,0250 g) foram solubilizadas em 10 mL de água destilada (50°C, 1 h) e homogeneizadas em vortex. Alíquotas de 1 mL de cada solução inicial foram diluídas com 9 mL de álcool etílico absoluto. A solução resultante foi utilizada diretamente na leitura espectrofotométrica (SP 22, Biospectro) a 427 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de curcumina/ FDO.

4.6. Uniformidade da concentração de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral

A uniformidade das doses unitárias dos filmes de desintegração oral ($FDO = 6 \text{ cm}^2$), em relação ao teor de flavonóides e curcuminóides, foi realizada de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2010). Para a realização das análises foram utilizadas 10 unidades de cada concentração dos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira (0,25 mg, 0,50 mg e 0,75 mg de flavonoides/ FDO) e dos filmes incorporados com o extrato de cúrcuma (0,25 mg, 0,50 mg e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO). O valor de aceitação (VA) foi calculado de acordo com a equação 1. Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), o produto cumpre o teste de uniformidade se o valor de aceitação calculado para as primeiras 10 unidades testadas não é superior a 15%.

$$VA = |M - X| + k.s \quad (1)$$

Onde: X é a média dos conteúdos individuais expressa como porcentagem da quantidade declarada (%), $k = 2,4$ é a constante de aceitabilidade para o número de unidades testadas ($n = 10$), s é o desvio padrão da amostra e M (%) um valor de referência determinado em função de X (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.7. Estudo da liberação *in vitro* de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral

O estudo da liberação *in vitro* de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma, respectivamente, foi baseado na metodologia proposta por Perumal et al., 2008. Para a análise, uma dose unitária ($FDO = 6 \text{ cm}^2$) de cada filme nas diferentes concentrações de flavonóides (0,25; 0,50 e 0,75 mg/ FDO) e curcuminóides (0,25; 0,50 e 0,75 mg/ FDO) foi colocada em um tubo de ensaio contendo água destilada (20 mL) como meio de dissolução, e mantida a 37°C sob agitação de 100 rpm. Em intervalos de tempo pré-determinados (15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos) foram retiradas do meio de dissolução as alíquotas necessárias às análises de flavonóides (0,5 mL) e curcuminóides (1 mL), sendo que o volume da alíquota retirado foi repostado por igual volume de água. A análise de flavonóides foi realizada segundo Park et al. (1995) e a de curcuminóides de acordo Kumar et al. (2010), descritas anteriormente. Os resultados foram expressos graficamente através da porcentagem de liberação do princípio ativo (flavonóides ou curcuminóides) em função do tempo.

4.8. Propriedades funcionais dos extratos e dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma

4.8.1. Atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante *in vitro* dos extratos de erva baleeira e cúrcuma, e dos filmes de desintegração oral contendo estes extratos foi determinada através dos seguintes métodos:

seqüestro de radicais livres DPPH, capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu, determinação do poder redutor do ferro (FRAP) e capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC).

4.8.1.1. Sequestro de radicais livres DPPH

A atividade antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH, para os extratos, foi realizada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). A atividade sequestrante do radical DPPH foi medida em uma mistura contendo 3,9 mL do radical DPPH (0,06 mmol/L) e 0,1 mL do extrato de erva baleeira ou cúrcuma, e para o controle 0,1 mL de álcool. O solvente utilizado no preparo da solução do radical DPPH e dos extratos foi o álcool etílico absoluto. A solução (DPPH· + extrato) foi homogeneizada rapidamente e mantida por 30 minutos a 25°C, na ausência de luz. A capacidade sequestrante foi avaliada através da redução na leitura da absorbância (A) realizada em espectrofotômetro (SP 22, Biospectro) a 515 nm, e calculada através da equação 2. A atividade antioxidante foi expressa como EC₅₀, que é definida como a concentração do composto de interesse necessária para a inibição de 50% do radical DPPH. Para a determinação do EC₅₀, os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram preparados em concentrações entre 0,05 e 0,005 mL/ mL de solução.

$$Atividade_sequestrante_DPPH\cdot (\%) = \frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{A_{controle}} 100 \quad (2)$$

Também foi construída uma curva para a atividade antioxidante utilizando o trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) como padrão. Os resultados foram expressos em μmol equivalentes de trolox/ mL de extrato.

Para os filmes de desintegração oral contendo os extratos de erva baleeira e cúrcuma, a atividade sequestrante dos radicais DPPH foi realizada de acordo com Martins et al. (2012). Os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma, em todas as concentrações estudadas, foram inicialmente solubilizados na proporção de 0,0500 g de filme/10 mL de água (50°C, 1h). Para a análise, 1 mL de cada filme solubilizado foi misturado a 4 mL da solução do radical DPPH (0,06 mmol/L). As soluções foram homogeneizadas em vortex e mantidas por 2 h em repouso (25°C), na ausência de luz. A leitura da absorbância foi feita em um espectrofotômetro (SP 22, Biospectro) no comprimento de onda de 515 nm. Através da equação 2 calculou-se a atividade sequestrante do radical DPPH, expressa como porcentagem de inibição. Construiu-se também uma curva de calibração utilizando-se o antioxidante trolox como padrão e os resultados foram expressos em μmol equivalentes de trolox/ FDO.

4.8.1.2. Capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu

Os extratos de erva baleeira e cúrcuma, e os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos foram analisados quanto ao poder redutor do reagente Folin-Ciocalteu, segundo Woisky e Salatino (1998). Os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram diluídos em álcool etílico (80%), e analisados nas concentrações de 0,01 mL de extrato de erva baleeira/mL de solução, e de 0,001 mL de extrato de cúrcuma/ mL de solução. Os filmes de

desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram previamente solubilizados em água (50°C, 1h) e analisados, respectivamente, nas concentrações de 0,0005 g de filme/mL de solução e 0,005 g de filme/mL de solução.

Na análise, alíquotas de 0,5 mL dos extratos diluídos ou dos filmes solubilizados foram misturados a 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água destilada (1:10), e 2,0 mL de carbonato de sódio (4%). Após homogeneização, as soluções foram mantidas em repouso por 2 horas, na ausência de luz. A absorbância foi determinada espectrofotometricamente (SP 22 Biospectro) a 740 nm. Para os extratos os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico/ mL de extrato, e para os filmes em mg equivalentes de ácido gálico/ FDO.

4.8.1.3. Determinação do poder redutor do ferro (FRAP)

Os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram avaliados quanto ao poder redutor do ferro (FRAP), segundo Benzie e Strain (1999). O antioxidante trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) foi utilizado com padrão de referência. Os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram analisados nas concentrações de 0,01 mL de extrato/mL de solução e 0,005 mL de extrato/mL de solução, respectivamente. Foram preparados os seguintes reagentes: (A) tampão acetato 300 mmol/L (pH 3,6), (B) TPTZ (2, 4, 6-tripyridyl-*s*-triazine) 10 mmol/L em 40 mmol/L de HCl e (C) FeCl₃. 6H₂O 20 mmol/L. O reagente FRAP foi preparado pela mistura das soluções A, B e C na proporção de 10:1:1. Para a análise, 100 µL da amostra ou do padrão foram misturados a 3000 µL do reagente FRAP, homogeneizados e mantidos em um banho termostático a 37°C, por 30 minutos. Após este período, a

absorbância foi determinada espectrofotometricamente (SP 22 Biospectro) no comprimento de onda de 593 nm, utilizando-se o reagente FRAP como branco. Os resultados foram expressos em μmol equivalentes de trolox/ mL de extrato.

Para os filmes, a concentração utilizada na análise foi de 0,0005 g de filme/ mL de solução para os filmes com o extrato de erva baleeira e 0,005 g de filme/ mL de solução para os filmes com o extrato de cúrcuma. O procedimento foi o mesmo realizado para a análise dos extratos. Os resultados foram expressos em μmol equivalentes de trolox/ FDO.

4.8.1.4. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)

A capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) dos extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*), e dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos, nas diferentes concentração estudadas (0,25 mg, 0,50 mg, 0,75 mg de flavonóides ou curcuminóides/ FDO) foi determinada segundo a metodologia proposta por Chisté et al. (2011), utilizando-se uma microplaca de 96 poços e um leitor de microplacas (SpectraMax M3, Molecular Devices).

Para a análise, os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram diluídos em tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,4), respectivamente, na proporção de 1:1000 e de 1:2000. Os filmes incorporados com os extratos foram inicialmente solubilizados em água destilada (0,0500 g/ 10 mL de água, 50°C, 1 h) e, posteriormente, a solução inicial de cada filme foi diluída adequadamente em tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,4). Os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira apresentaram as seguintes diluições: 0,25 mg de flavonóides (1:10), 0,50 mg de flavonóides (1:20) e 0,75 mg de flavonóides (1:50). Os filmes

incorporados com os extratos de cúrcuma, nas concentrações de 0,25, 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides, foram diluídos na proporção de 1:100.

Cada poço da microplaca foi preenchido com alíquotas de 30 μ L do padrão, controle ou amostra, 60 μ L da solução de fluoresceína (508,25 mM) e 110 μ L da solução de AAPH (76 mM). As soluções foram preparadas em tampão fosfato de potássio (75 mM, pH 7,4), que também foi utilizado como controle na análise. Para o desenvolvimento da reação, a placa foi incubada à 37°C e a leitura da fluorescência foi realizada a cada minuto, por um período de 2 horas. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 485 e 528 nm, respectivamente. O composto trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), nas concentrações de 12,5 a 400 μ mol/L, foi utilizado como padrão para a construção da curva de calibração (AUC_{net} versus concentração de trolox), utilizando-se as equações 3 e 4. A análise gera uma curva de decaimento da fluorescência em função do tempo, cuja área sob a curva (AUC) é calculada através da equação 3, pelo software do equipamento.

$$AUC = 1 + ((f_1 + f_2 + f_3 + \dots + f_i) / f_0) \quad (3)$$

Onde f_0 é a fluorescência relativa ao tempo 0 e f_i , a fluorescência relativa ao tempo i . A AUC_{net} é calculada pela subtração da AUC do controle do valor da AUC da amostra ou padrão, de acordo com a equação 4:

$$AUC_{net} = AUC_{amostra} - AUC_{controle} \quad (4)$$

$$AUC_{net} = AUC_{padrão} - AUC_{controle}$$

Os valores de AUC_{net} (x) do padrão, obtidos na equação 4, foram plotados com os valores das concentrações de trolox (y), obtendo-se a curva de calibração. Com os valores de AUC_{net} das amostras é possível obter a capacidade de absorção de radicais oxigênio das mesmas, cujos resultados foram expressos em μmol equivalentes de trolox/mL de extrato e em μmol equivalentes de trolox/ FDO.

4.8.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos extratos de erva baleeira e cúrcuma, bem como dos filmes de desintegração oral incorporados com extratos foi realizada utilizando-se o método de difusão em ágar (NCCLS M7-A6) utilizando a bactéria *Streptococcus mutans* (ATCC 25175, CCT 3440) e o fungo *Candida albicans* (ATCC 10231, CCT 0776) doados pela Fundação André Tosello. Os microrganismos foram reativados em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Após o período de incubação, as suspensões microbianas foram padronizadas em 0,5 Mac na escala de Mac Farland, que corresponde a uma absorbância entre 0,08 e 0,1 (1 a 2×10^8 UFC/mL). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (SP 22, Biospectro) a 625 nm. Depois da padronização, a suspensão de *S. mutans* foi inoculada em placas de ágar nutriente e a suspensão de *Candida albicans* em placas de ágar sabouraud, utilizando-se swabs estéreis. Os discos do controle positivo (antibiótico cloranfenicol), do controle negativo (filme 80A:20HPMC), dos extratos de erva baleeira e cúrcuma, e dos filmes incorporados com os extratos foram então colocados sobre o ágar com o auxílio de uma pinça estéril. Em seguida, as placas foram incubadas em uma BOD (MA

415, Marconi) a 37°C por 24 horas. As placas inoculadas com a bactéria *Streptococcus mutans* foram incubadas em condições de microaerofilia.

Os discos contendo os extratos foram preparados pela dispersão de 20 µL dos extratos de erva baleeira e cúrcuma em discos de papel estéreis. Os mesmos foram secos a 37°C para eliminar todo o álcool etílico. Os diâmetros (mm) dos halos de inibição foram medidos considerando-se o diâmetro dos discos.

4.8.3. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória *in vitro* dos extratos e dos filmes de desintegração oral foi avaliada em função da inibição da enzima cicloxigenase 2 (COX-2), utilizando um kit inibidor de COX (COX Inhibitor Screening Assay Kit, 96 wells – Cayman Chemical), e um fotômetro de microplaca (Multiskan FC, Thermo Scientific). Todas as reações foram realizadas seguindo as orientações do fabricante. O extrato de erva baleeira analisado foi diluído na proporção de 1:10, utilizando como solvente álcool etílico (80%). O extrato de cúrcuma de cúrcuma foi analisado puro e na diluição de 1:10, utilizando álcool etílico absoluto como solvente. Os filmes contendo os extratos de erva baleeira e de cúrcuma, em todas as concentrações estudadas, foram solubilizados em água (0,05 g/5 mL de água, 50°C, 1 h). O anti-inflamatório comercial, a dexametasona, foi utilizada como controle positivo.

A cicloxigenase (COX) também chamada de prostaglandina H sintase (PGHS) é uma enzima bifuncional exibindo atividade de COX e peroxidase. A componente COX converte o ácido araquidônico em hidroperoxi endoperóxido (PGG₂), e a componente peroxidase reduz o endoperóxido ao álcool correspondente (PGH₂), o precursor das prostaglandinas (PGs),

tromboxanos e prostaciclina, substâncias presentes em processos inflamatórios. As reações realizadas no kit permitem a quantificação final de prostaglandinas. As substâncias anti-inflamatórias atuam inibindo a COX-2, logo havendo redução da síntese de prostaglandinas e consequentemente da intensidade do processo inflamatório. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) de inibição da enzima COX-2.

4.9. Estabilidade

Os extratos de erva baleeira e cúrcuma, e os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos foram armazenados durante 90 dias sob condições controladas de 25°C e 60% de umidade relativa, e de 40°C e 75% de umidade relativa, de acordo com Garsuch e Breitzkreutz (2010), utilizando-se dessecadores com soluções saturadas de NaBr (60% UR) e KCl (75% UR) e uma incubadora BOD (MA 415, Marconi). Os extratos de erva baleeira e de cúrcuma foram armazenados em frascos herméticos, e submetidos, portanto, somente à temperatura de armazenamento. Os filmes foram cortados em doses unitárias ($FDO = 6 \text{ cm}^2$) e armazenados sem embalagem. Nos intervalos de 0, 20, 40, 60 e 90 dias, os extratos e os filmes foram avaliados quanto ao teor de flavonóides, curcuminóides e em relação à atividade anti-inflamatória.

4.10. Avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma

A avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma foi realizada através de um teste de aceitação, utilizando-se uma escala hedônica estruturada mista de 9 pontos. Cinquenta provadores não treinados (33 mulheres e 17 homens) com idades entre 17 e 40 anos, avaliaram os atributos aparência, conforto, sabor, sensação e aceitação global das amostras codificadas. Os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira (0,25 mg, 0,50 mg e 0,75 mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (0,25 mg, 0,50 mg e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO) foram analisados separadamente. As amostras dos filmes foram apresentadas em doses unitárias (6 cm²), e os provadores foram orientados a ingerir água entre as amostras e a consumir, quando necessário, biscoito água e sal para a neutralização do paladar. A seguir são apresentados o termo de consentimento dos provadores (Figura 11) e a ficha de avaliação sensorial (Figura 12).

Termo de consentimento livre e esclarecido

Consentimento formal de participação no trabalho de pesquisa: "AVALIAÇÃO SENSORIAL DE FILMES DE DESINTEGRAÇÃO ORAL COMO VEÍCULO DE COMPOSTOS BIOATIVOS".

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ Fone: _____

JUSTIFICATIVA: Filmes de desintegração oral são filmes ultrafinos produzidos partir de diferentes macromoléculas (amido, gelatina, hidroxipropilmetil celulose, entre outras) e que apresentam várias vantagens em relação às formas convencionais de medicamentos, como facilidade de administração e não necessidade de água. Além disso, devido à mucosa oral ser altamente vascularizada, os princípios ativos incorporados nestes filmes podem entrar diretamente na circulação sistêmica, sem a passagem pelo metabolismo hepático. Esses filmes podem veicular não apenas compostos ativos sintéticos, mas também compostos naturais com propriedades funcionais (antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória), como os extratos das plantas erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*), ricos em flavonóides e curcuminóides, respectivamente.

OBJETIVOS: O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma, e avaliação de suas propriedades funcionais (antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória) e sensoriais.

OUTRAS INFORMAÇÕES:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Os provadores não terão qualquer tipo de **despesas em decorrência da participação nesta pesquisa.**
- **Não há possibilidade de risco ou qualquer tipo de desconto** em função da participação nesta pesquisa, uma vez que todos os ingredientes utilizados nos produtos são inteiramente seguros e serão de boa qualidade e procedência e o processo de fabricação será realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação.
- Em função do exposto no item anterior, não há **previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto.**
- Os testes para avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos **serão acompanhados** pela equipe de pesquisa.
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "AVALIAÇÃO SENSORIAL DE FILMES DE DESINTEGRAÇÃO ORAL COMO VEÍCULO DE COMPOSTOS BIOATIVOS". Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores. Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Pirassununga, _____ de _____ de 2014

Assinatura: _____

Figura 11. Termo de consentimento livre e esclarecido de participação na avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.

Filme de desintegração oral incorporado com extrato de erva baleeira (ou cúrcuma)

Nome: _____ Idade: _____ data _____

Por favor, avalie as amostras do filme de desintegração oral incorporado com extrato de erva baleeira (ou cúrcuma) utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou dos atributos **aparência**, **conforto** (conveniência na forma de administração e rapidez de desintegração do filme), **sabor**, **sensação após administração** (algum resíduo após a administração) e **aceitação global**.

Amostra n° _____

Aparência	
Conforto	
Sabor	
Sensação	
Aceitação Global	

1. Detestei
2. Desgostei muito
3. Desgostei regularmente
4. Desgostei ligeiramente
5. Indiferente
6. Gostei ligeiramente
7. Gostei regularmente
8. Gostei muito
9. Adorei

Você compraria este produto? () Sim () Não

Comentários: _____

Figura 12. Ficha de avaliação sensorial do teste de aceitação dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.

4.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional SAS (SAS, versão 9.2). As diferenças significativas entre as médias foram identificadas através dos testes de Duncan ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Produção e caracterização dos extratos de erva baleeira e cúrcuma

As concentrações de flavonóides e curcuminóides nos extratos de erva baleeira e cúrcuma, respectivamente, referentes ao estudo da extração encontram-se nas Tabelas 3 e 4. Os resultados das extrações mostram que, tanto para a erva baleeira quanto para a cúrcuma, o aumento na relação de planta (g)/ solvente (mL) promoveu um aumento significativo na concentração dos compostos de interesse, flavonóides e curcuminóides, em cada extrato.

Logo, como o objetivo deste estudo foi obter a maior concentração possível de flavonóides e curcuminóides, visando sua aplicação posterior nos filmes de desintegração oral, a relação de 20 g de planta/ 100 mL de etanol 80% foi considerada a mais adequada para a produção dos extratos de erva baleeira e cúrcuma.

Tabela 3. Concentração de flavonóides no extrato de erva baleeira em função da variação da relação planta/ solvente utilizada na extração.

Relação planta/ solvente (g de erva baleeira/100 mL de etanol 80%)	Flavonóides (mg eq. de quercetina/mL de extrato)
10	0,36 ± 0,01 ^c
15	0,52 ± 0,02 ^b
20	0,72 ± 0,03 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos de erva baleeira. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Tabela 4. Concentração de curcuminóides no extrato de cúrcuma em função da variação da relação planta/ solvente utilizada na extração.

Relação planta/ solvente (g de cúrcuma/100 mL etanol 80%)	Curcuminóides (mg eq. de curcumina/mL de extrato)
10	$6,4 \pm 0,1^c$
15	$11,0 \pm 0,3^b$
20	$13,7 \pm 0,3^a$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os extratos de cúrcuma. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Os extratos de erva baleeira e cúrcuma produzidos na concentração de 20 g de erva baleeira ou cúrcuma/ 100 mL de etanol 80% foram concentrados e os resultados estão apresentados na Tabela 5. O extrato de erva baleeira, concentrado em 50% de seu volume inicial apresentou um aumento de 95% na concentração de flavonóides. Para o extrato de cúrcuma, concentrado a 70% de seu volume inicial, o aumento na concentração de curcuminóides foi de 19%.

Tabela 5. Concentração de flavonóides (mg eq. de quercetina/ mL de extrato) e curcuminóides (mg eq. de curcumina/ mL de extrato) nos extratos concentrados de erva baleeira e cúrcuma.

Extrato	Flavonóides (mg eq. de quercetina/mL de extrato)	Curcuminóides (mg eq. de curcumina/mL de extrato)
Inicial	$0,72 \pm 0,03$	$13,7 \pm 0,3$
Concentrado	$1,40 \pm 0,05$	$16,3 \pm 0,2$

5.2.Filmes de desintegração oral sem extrato

5.2.1. Aspecto visual

A avaliação visual dos filmes de desintegração oral mostrou que os filmes produzidos com as seguintes relações (%) entre amido e hidroxipropilmetil celulose (A:HPMC): 10A:90HPMC, 20A:80HPMC, 30A:70HPMC, 40A:60HPMC, 50A:50HPMC e 60A:40HPMC apresentaram superfícies muito irregulares e com separação de fase entre as macromoléculas utilizadas. Baseando-se nestes resultados, estas formulações foram descartadas das análises posteriores e consideradas inadequadas para o desenvolvimento dos filmes de desintegração oral, devido à falta de homogeneidade observada nos mesmos.

As formulações 100A:0HPMC, 90A:10HPMC, 80A:20HPMC, 70A:30HPMC e 0A:100HPMC, entretanto, produziram filmes resistentes e com superfícies homogêneas, sendo selecionadas para as caracterizações posteriores.

5.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

Na Figura 13 são apresentadas as imagens da microscopia eletrônica de varredura da superfície dos filmes de desintegração oral de formulações 10A:90HPMC, 20A:80HPMC, 30A:70HPMC, 40A:60HPMC, 50A:50HPMC e 60A:40HPMC. As micrografias mostram descontinuidades bastante acentuadas nas matrizes de formulações 10A:90HPMC a

50A:50HPMC. Na formulação de 60A:40HPMC, as discontinuidades foram menos evidentes, mas a superfície mostrou-se também bastante irregular. As características microscópicas destas formulações se refletiram no aspecto bastante heterogêneo dos filmes observados visualmente, possivelmente devido à separação de fases entre as macromoléculas amido e HPMC. Logo, as micrografias também foram utilizadas na seleção das formulações para a produção dos filmes de desintegração oral.

Figura 13. Imagens da superfície dos filmes de desintegração oral obtidas por microscopia eletrônica de varredura em função da variação da relação (%) entre amido (A): hidroxipropilmetil celulose (HPMC): (a) 10A:90HPMC (1200x); (b) 20A:80HPMC (1200x); (c) 30A:70HPMC (1200x); (d) 40A:60HPMC (1200x); (e) 50A:50HPMC (1200x); (f) 60A:40HPMC (1200x).

As micrografias dos filmes de desintegração oral de formulações 100A:0HPMC, 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC, 0A:100HPMC apresentaram homogeneidade em relação ao aspecto visual e foram selecionadas para as caracterizações posteriores (Figura 14). O filme produzido com a formulação 0A:100HPMC (Figuras 14a, 14b) apresentou uma estrutura superficial e interna bastante homogênea e compacta. O filme de formulação 100A:0HPMC (Figuras 14c, 14d) apresentou uma estrutura superficial com algumas irregularidades, mas internamente apresentou-se homogêneo e compacto.

À medida que se aumentou a concentração de HPMC nos filmes, formulações 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC (Figuras 14e, 14f, 14g, 14h, 14i, 14j), verificou-se que a estrutura superficial e interna tornou-se mais irregular e heterogênea, evidenciando possivelmente a separação de fases entre as macromoléculas amido e HPMC, o que também pode estar associado ao aparecimento das regiões mais claras observadas nas micrografias. No entanto, as matrizes mantiveram a coesividade e a integridade física, diferentemente das formulações 10A:90HPMC, 20A:80HPMC, 30A:70HPMC, 40A:60HPMC, 50A:50HPMC.

Chen, Liu e Zhang (2014) encontraram resultados bastante semelhantes em filmes de amido de mandioca. Akhtar et al. (2013) e Sánchez-González et al. (2009) também verificaram em filmes de HPMC uma estrutura interna lisa e contínua. No entanto, Villacrés et al (2014) observaram nos filmes de amido e HPMC estruturas bastante irregulares tanto na superfície quanto internamente, o que também foi observado na blenda amido-HPMC. Entretanto, todos os filmes apresentaram uma estrutura bastante compacta, sugerindo alta integridade estrutural dos mesmos (VILLACRÉS et al., 2014). Jiménez et al. (2012) observaram que os filmes contendo apenas amido ou HPMC apresentaram uma estrutura interna homogênea, no entanto a mistura dos polissacarídeos produziu filmes com estrutura heterogênea, mostrando a separação de fase entre amido e HPMC.

Figura 14. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A): hidroxipropilmetil celulose (HPMC) nas formulações: (a) 0A:100HPMC, imagem da superfície (1200x); (b) 0A:100HPMC, imagem da fratura (2000x); (c) 100A:0HPMC, imagem da superfície (1200x); (d) 100A:0HPMC, imagem da fratura (2000x); (e) 90A:10HPMC, imagem da superfície (1200x); (f) 90A:10HPMC, imagem da fratura (2000x); (g) 80A:20HPMC, imagem da superfície (1200x); (h) 80A:20HPMC, imagem da fratura (2000x); (i) 70A:30HPMC, imagem da superfície (1200x); (j) 70A:30HPMC, imagem da fratura (2000x).

5.2.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

No espectro do filme de formulação 100A:0HPMC (Figura 15), o comprimento de onda de 3301 cm^{-1} refere-se ao estiramento dos grupos hidroxila (O – H) livres, e ligados intra e intermolecularmente, que representam a maior estrutura do amido (COATES, 2000; ZHANG, HAN; 2006; VILLACRÉS, FLORES, GERSCHENSON; 2014). O pico de 2926 cm^{-1} é característico ao estiramento C – H do anel de glicose. As bandas localizadas entre 1700 e 1600 cm^{-1} estão associadas ao estiramento O – H das moléculas de água fortemente ligadas ao amido (ZHANG, HAN; 2006; VILLACRÉS, FLORES, GERSCHENSON; 2014). Os picos 1245 e 1367 cm^{-1} são associados à flexão O – H dos álcoois primários e secundários (COATES, 2000). Os picos 993 cm^{-1} e 1077 cm^{-1} referem-se ao estiramento C – O do anel de anidroglicose (ZHANG, HAN; 2006; VILLACRÉS, FLORES, GERSCHENSON; 2014).

Para o espectro do filme de formulação 0A:100HPMC (Figura 15), o pico de absorção com comprimento de onda de 3417 cm^{-1} refere-se ao estiramento O – H, o pico 2903 cm^{-1} refere-se ao estiramento C – H e grupos metil, as bandas entre 1600 e 1700 cm^{-1} estão associadas ao grupo C = O, o pico de 1454 cm^{-1} refere-se aos grupos C – H, e entre 900 e 1300 cm^{-1} encontram-se os estiramentos C – O – C (PALLA-PAPAVLU et al., 2013).

Observando os espectros dos filmes produzidos com as macromoléculas isoladas, e dos filmes produzidos com amido e hidroxipropilmetil celulose, verificou-se que, à medida que se aumentou a concentração de HPMC nas formulações (90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC), houve o deslocamento dos seguintes picos em relação ao filme de amido (100A:0HPMC): 3301 para 3421 cm^{-1} , 2926 para 2902 cm^{-1} , 993 para 1020 cm^{-1} , e de 932 para 943 cm^{-1} . Esses deslocamentos se devem, provavelmente, à incorporação nas matrizes dos grupamentos O – H, C – H e C – O provenientes das moléculas de HPMC, além daqueles

derivados das moléculas de amido, que apresentam, conforme já discutido, algumas variações nos picos de absorção, como pode ser observado nos espectros dos filmes produzidos com as macromoléculas isoladas (100A:0HPMC e 0A:100HPMC).

O pico 1454 cm^{-1} (grupos C – H) presente no espectro do filme de HPMC (0A:100HPMC) não é observado no filme de amido (100A:0HPMC), mas, nas formulações 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC, picos de absorção em torno de 1452 cm^{-1} foram verificados. Estas variações dos picos de absorção mostram que o aumento na concentração de HPMC tornou os espectros dos filmes com características mais próximas ao filme de HPMC (0A:100HPMC). Na formulação de 70A:30HPMC este comportamento foi muito evidente. A banda de absorção no comprimento de onda de 759 cm^{-1} presente no filme de amido também foi observada nos filmes 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC. Entretanto os picos 1077 e 1149 cm^{-1} do filme de amido não foram verificados no filme 70A:30HPMC.

Apesar dos deslocamentos dos picos de absorção dos espectros, não foram observados o aparecimento de novos picos, o que indica que o amido e a HPMC não apresentaram nenhuma interação química, encontrando-se apenas dispersos na matriz polimérica. Este resultado, talvez, permita compreender porque nos filmes com altas concentrações de HPMC (10A:90HPMC, 20A:80HPMC, 30A:70HPMC, 40A:60HPMC, 50A:50HPMC e 60A:40HPMC) a separação de fases entre as macromoléculas foi tão evidente.

Figura 15. Espectros de infravermelho dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC): (1) 100A:0HPMC, (2) 90A:10HPMC, (3) 80A:20HPMC, (4) 70A:30HPMC, (5) 0A:100HPMC.

5.2.4. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas, umidade e espessura dos filmes de desintegração oral estão apresentadas na Tabela 6. As diferentes formulações não apresentaram variação significativa em relação à espessura dos filmes, e quanto à umidade apenas os filmes

produzidos com as macromoléculas isoladas (100A:0HPMC e 0A:100HPMC) diferiram significativamente.

Os filmes de formulações 100A:0HPMC e 0A:100HPMC variaram significativamente quanto à tensão na ruptura e porcentagem de alongação, mas em relação ao módulo elástico não houve diferença significativa entre as formulações. Estes resultados mostram que o filme produzido apenas com hidroxipropilmetil celulose apresentou maior resistência mecânica em relação ao filme produzido apenas com amido. Na formulação 90A:10HPMC, é possível verificar que a adição de HPMC na matriz promoveu um aumento da resistência mecânica em relação ao filme de amido. Possivelmente, nesta concentração, a HPMC tenha aumentado a força de interação entre as moléculas de amido, promovendo a formação de uma matriz mais coesa e resistente.

Entretanto, à medida que se aumentou a concentração de HPMC nos filmes, formulações 80A:20HPMC e 70A:30HPMC, o efeito foi contrário, uma vez que houve redução significativa na tensão de ruptura e módulo elástico dos filmes, embora a alongação não tenha sido afetada. O aumento de HPMC na matriz promoveu uma estrutura mais irregular, tanto superficialmente quanto internamente, assim como observado nas imagens fornecidas pela microscopia eletrônica de varredura (Figura 14), o que provavelmente se refletiu na redução da coesividade da matriz polimérica e consequentemente na tensão de ruptura dos filmes. O aumento de HPMC nas formulações também aumentou a separação de fases entre as macromoléculas, o que talvez tenha ocasionado a redução das forças intermoleculares entre as moléculas de amido, diminuindo a resistência mecânica dos filmes.

Os resultados encontrados para os filmes de formulações 100A:0HPMC e 0A:100HPMC encontram-se próximos a outros estudos realizados. Ortega-Toro et al. (2014) obtiveram para a tensão na ruptura, porcentagem de alongação e módulo elástico, respectivamente, os valores de 24,3 MPa, 2,5% e 2115 MPa. Segundo Moura et al. (2012), a

tensão na ruptura para filmes de HPMC foi de 28,3 MPa, alongação de 8,1% e módulo elástico de 900 MPa. Imran et al. (2010) encontraram para filmes de HPMC plastificados com glicerol uma tensão de 27 MPa e módulo elástico de 1098 MPa. Mishra e Amin (2009) verificaram para filmes com 2% de HPMC, tensão de 19,49 MPa, alongação de 1,82% e módulo elástico de 654,6 MPa.

Em relação aos filmes produzidos com amido e HPMC, resultado muito semelhante foi encontrado por Jiménez et al. (2012), que verificaram que o filme contendo apenas HPMC apresentou o maior valor da tensão na ruptura (23,26 MPa), seguido pelo filme de amido (20,0 MPa), e que o aumento na concentração de HPMC ocasionou também redução deste parâmetro.

Tabela 6. Espessura (mm), umidade (g de água/100 g de filme), tensão na ruptura (T), alongação (E), e módulo elástico (ME) dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).

Relação (%) A : HPMC	Espessura	Umidade	T (MPa)	E (%)	ME (MPa)
100:0	0,058 ± 0,002 ^a	9,5 ± 1,2 ^a	20,8 ± 1,4 ^b	2,5 ± 0,2 ^b	1120,7 ± 1,3 ^{ab}
90:10	0,059 ± 0,004 ^a	9,0 ± 0,3 ^a	23,1 ± 2,2 ^a	2,3 ± 0,3 ^b	1218,6 ± 1,4 ^a
80:20	0,060 ± 0,004 ^a	8,5 ± 1,0 ^{ab}	19,7 ± 1,7 ^b	2,1 ± 0,4 ^b	1030,0 ± 2,3 ^b
70:30	0,062 ± 0,002 ^a	8,7 ± 0,4 ^a	16,6 ± 1,4 ^c	2,2 ± 0,3 ^b	905,9 ± 1,2 ^c
0:100	0,060 ± 0,003 ^a	7,8 ± 0,3 ^b	24,3 ± 2,4 ^a	7,4 ± 3,0 ^a	1111,0 ± 1,4 ^{ab}

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral sem extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

5.2.5. Mucoadesividade *in vitro*

Os resultados da análise de mucoadesividade *in vitro* dos filmes de desintegração oral (Tabela 7), mostram que o filme produzido apenas com amido (100A:0HPMC) foi o que apresentou a maior força mucoadesiva, seguido pelo filme à base de hidroxipropilmetil celulose (0A:100HPMC). Os filmes produzidos com amido e HPMC, formulações 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC, apresentaram forças mucoadesivas com valores intermediários aos filmes produzidos com as macromoléculas isoladas. Também foi possível verificar que o aumento na concentração de HPMC tornou os filmes significativamente menos mucoadesivos. Estes resultados mostram como a adesão entre filme e mucosa é altamente variável e dependente dos tipos de polímeros utilizados, isolados ou em blends, e de suas características químicas.

Tabela 7. Força mucoadesiva (F) dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).

Relação (%) A : HPMC	F (N)
100:0	1,9 ± 0,3 ^a
90:10	1,0 ± 0,2 ^c
80:20	0,6 ± 0,1 ^d
70:30	0,4 ± 0,1 ^d
0:100	1,4 ± 0,2 ^b

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral sem extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

A estrutura química dos polímeros e seus grupos funcionais podem afetar o grau de interação entre o polímero e a mucosa, interferindo assim nos sistemas mucoadesivos de

liberação de princípios ativos (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009). A bioadesão dos polímeros aos substratos biológicos ocorre através da interpenetração e da formação de ligações secundárias não covalentes entre os substratos. Como as ligações secundárias ocorrem principalmente devido à formação de ligações de hidrogênio, polímeros que apresentam grupos hidrofílicos funcionais como carboxila (COOH), hidroxila (OH), amida (NH₂) e grupos sulfato (SO₄H) podem ser mais mucoadesivos (ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2009).

Considerando os polímeros utilizados na preparação dos filmes de desintegração oral, deve-se destacar que o amido apresenta em sua estrutura molecular os grupos -CH₂OH e OH, e que a hidroxipropilmetil celulose apresenta em sua molécula os grupos -CH₃ ou -CH₂CH(CH₃)OH. Logo, o amido apresenta maior capacidade de formação de ligações de hidrogênio com a mucosa do que a hidroxipropilmetil celulose, e, portanto, o filme de formulação 100A:0HPMC apresentou uma maior força mucoadesiva em relação ao filme de formulação 0A:100HPMC. À medida que houve um aumento na concentração de HPMC nos filmes, formulações 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC, a força mucoadesiva diminuiu, possivelmente, devido à diminuição dos grupos hidroxila provenientes do amido.

Outros estudos mostram como a mucoadesividade é variável e altamente dependente dos polímeros utilizados nos filmes de desintegração oral. Peh e Wong (1999) observaram para filmes à base de hidroxipropilmetil celulose e de carboximetil celulose sódica, respectivamente, forças mucoadesivas de 2,77 N e 4,43 N. Hagesaether et al. (2009) obtiveram em filmes de quitosana e pectina, respectivamente, forças mucoadesivas de 100 gf (0,981 N) e aproximadamente 180 gf (1,77 N),

Mura et al. (2010) estudaram a mucoadesividade em filmes contendo quitosana, KollicoatIR[®] (polímero filmogênico) e glicerol, encontrando forças que variaram entre 0,33 e 0,41 N. Mohamed et al. (2011) observaram para filmes de alginato de sódio e carboximetil

celulose sódica uma força mucoadesiva de 0,663 N e para filmes de HPMC e carboximetil celulose sódica o valor de 0,469 N, o que demonstra que o alginato de sódio apresenta propriedade mucoadesiva superior à HPMC devido à presença de numerosos grupos carboxila e hidroxila.

Verma e Chattopadhyay (2012) verificaram para filmes de quitosana uma força mucoadesiva de 5,15 N e em filmes de carboximetil celulose sódica o valor de 0,87 N. Abruzzo et al. (2012) estudaram a mucoadesividade *in vitro* de filmes contendo gelatina e quitosana, e verificaram que o aumento na concentração de gelatina promoveu redução na força mucoadesiva dos filmes, com valores que variaram entre 0,187 mN (100% quitosana) a 0,103 mN (100% gelatina). Jones et al. (2013) investigaram o efeito do aumento da concentração de HPMC, em filmes à base de HPMC e Eudragit[®], sobre a mucoadesividade *in vitro*, cujos resultados variaram de 2184,56 mN a 1116, 44 mN quando a concentração do polímero variou de 0,25 a 1% nos filmes.

5.2.6. Tempo de desintegração *in vitro*

Na análise do tempo de desintegração *in vitro*, foram utilizadas apenas as formulações com as seguintes relações (%) entre amido e hidroxipropilmetil celulose (A:HPMC): 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC, cujos resultados estão apresentados na Tabela 8.

Os filmes estudados apresentaram tempos de desintegração inferiores a 30 segundos, o que os caracteriza como filmes de desintegração oral rápida. As diferentes formulações não variaram significativamente entre si, apesar do aumento da concentração de HPMC na matriz.

Tabela 8. Tempo de desintegração *in vitro* dos filmes de desintegração oral em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).

Relação (%) A : HPMC	Tempo (segundos)
90:10	21,3 ± 2,6 ^a
80:20	20,6 ± 2,4 ^a
70:30	20,8 ± 2,0 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral sem extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

De acordo com Garsuch e Breitzkreutz (2010), os filmes de desintegração oral à base de carboximetil celulose apresentaram tempos de desintegração inferiores a 10 segundos e para os filmes à base de hidroxipropilmetil celulose os tempos foram inferiores a 15 segundos. Para filmes à base de celulose microcristalina, hidroxipropilmetil celulose e hidroxipropil celulose, Nishimura et al. (2009) observaram um tempo médio de desintegração de 21,9 segundos. Shimoda et al. (2009) verificaram que o tempo médio de desintegração dos filmes à base de celulose microcristalina, hidroxipropil celulose e hidroxipropilmetil celulose foi de 12,5 segundos. Mishra e Amin (2009) obtiveram para filmes de desintegração oral produzidos com diferentes concentrações de HPMC (1% a 4%), tempos de desintegração que variaram entre 12,5 e 30 segundos.

5.2.7. *Desintegração in vivo*

Os resultados referentes à seleção final dos provadores foram analisados, considerando se os provadores apresentaram consenso em relação às notas referentes (escala de intensidade) à desintegração dos filmes analisados. Para todos os provadores, os filmes 80A:20G e 80A:20HPMC utilizados no treinamento apresentaram, respectivamente, as maiores e menores notas na escala de intensidade utilizada. Este resultado foi condizente com os da etapa de treinamento, onde o filme 80A:20G apresentou desintegração mais lenta em relação ao filme 80A:20HPMC. Logo, 12 provadores treinados foram selecionados para a avaliação sensorial das amostras dos filmes de desintegração oral.

É importante ressaltar que se trata de um produto novo e de difícil avaliação sensorial, cujos resultados foram possivelmente afetados pelas condições fisiológicas dos provadores como a temperatura corporal e características da saliva, como o pH.

O filme à base amido (100A:0HPMC), utilizado no treinamento, apresentou como característica principal a formação de um gel na cavidade bucal, e consequentemente apresentou elevado tempo de desintegração, elevado teor residual e foi considerado inadequado pelos provadores. O filme à base de HPMC (0A:100HPMC) não foi avaliado, pois o objetivo principal de utilização deste polímero foi a redução do tempo de desintegração do filme de amido. Além do que, a hidroxipropilmetil celulose apresenta um custo muito superior ao amido, o que comercialmente torna-se desinteressante, e os filmes produzidos apenas com HPMC são muito higroscópicos, o que dificulta o armazenamento. Considerando estes aspectos, apenas as formulações 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC foram analisadas sensorialmente pelos provadores treinados.

Os resultados da desintegração *in vivo* dos filmes de desintegração oral são apresentados na Tabela 9. As formulações 90A:10HPMC, 80A:20HPMC e 70A:30HPMC não

diferiram significativamente entre si. No entanto, a formulação com a maior concentração de amido (90A:10HPMC) obteve a maior média entre as amostras. De acordo com os provadores, embora as amostras sejam bastante parecidas, a amostra 90A:10HPMC foi a que apresentou a desintegração mais lenta, inclusive com a formação de resíduos na boca no final da desintegração, o que se deve à formação de um gel devido ao amido. O aumento da concentração de HPMC nos filmes, segundo os provadores, tornou a desintegração dos filmes mais rápida e evitou a formação do gel característico do amido. Além do que, a amostra 80A:20HPMC foi a que apresentou a maior aceitação dos provadores quanto à sensação na boca.

Deve-se ressaltar que na análise sensorial utilizando-se a escala de intensidade são atribuídas notas pelos provadores treinados em uma escala de 9 pontos, onde os extremos da escala estão associados a filmes com desintegração rápida e lenta, utilizados nas etapas de treinamento. A desintegração dos filmes é um atributo de difícil avaliação, principalmente porque se trata de um produto relativamente novo.

Tabela 9. Notas atribuídas aos filmes de desintegração oral através da análise descritiva quantitativa (ADQ) em função da variação da relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC).

Relação (%) A : HPMC	Notas
90 : 10	2,9 ± 1,3 ^a
80 : 20	2,3 ± 1,2 ^a
70 : 30	2,4 ± 1,3 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral sem extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Comparando-se os resultados *in vitro* e *in vivo* verificou-se que a desintegração dos filmes apresentou o mesmo comportamento, embora *in vitro* as amostras tenham apresentado desintegração mais rápida, pois o tempo não estava relacionado à desintegração total do filme e sim apenas à capacidade da solução salina (pH 6,8) em perfurar o mesmo, simulando as condições da mucosa oral. Na análise *in vivo*, os provadores foram treinados para que os filmes se desintegrassem totalmente e não deixassem nenhum resíduo na cavidade bucal, caracterizando os mesmos quanto à sua velocidade de desintegração, rápida ou lenta.

Os resultados da análise de mucoadesividade (Tabela 7) mostram que o aumento da concentração de HPMC nas formulações dos filmes promoveu uma redução da força mucoadesiva, o que também se refletiu no tempo de desintegração dos filmes. Quanto menor a mucoadesividade, menor o tempo de desintegração dos filmes. A adição de HPMC nas formulações também produziu matrizes estruturalmente mais irregulares e menos coesas, conforme já discutido anteriormente, que favoreceram o tempo de desintegração dos filmes.

5.3. Filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma

Considerando as caracterizações das diferentes formulações dos filmes de desintegração oral sem extrato, o filme cuja relação (%) entre amido (A) e hidroxipropilmetil celulose (HPMC) foi de 80A:20HPMC apresentou-se visualmente homogêneo e com boas características microestruturais, com resistência mecânica e sobretudo com adequada mucoadesividade que se refletiu em um filme com rápida desintegração *in vivo*, caracterizando-o como um filme de desintegração oral rápida. Esta formulação também foi

considerada pelos provadores treinados a mais adequada quanto à sensação na boca e ausência de resíduos após a desintegração. Portanto, a formulação 80A:20HPMC foi selecionada para a produção dos filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma.

Os filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma foram produzidos de modo que as doses unitárias (FDO = 6 cm²) apresentassem as concentrações de 0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides ou curcuminóides/ FDO. Na Tabela 10 estão apresentadas as concentrações dos extratos utilizadas na produção dos filmes. Estas concentrações foram calculadas em função do teor de flavonóides (mg eq. de quercetina/ mL de extrato) e curcuminóides (mg eq. de curcumina/ mL de extrato) presentes, respectivamente, nos extratos de erva baleeira e cúrcuma concentrados (Tabela 5).

Tabela 10. Concentrações dos extratos de erva baleeira e cúrcuma utilizadas na produção dos filmes de desintegração oral (FDO) em função das diferentes concentrações de flavonóides e curcuminóides nas doses unitárias (0,25; 0,50 e 0,75 mg/ FDO).

Extrato	mg de flavonóides ou curcuminóides/ FDO	mL de extrato/100g de solução filmogênica
Erva baleeira	0,25	10,5
(1,4 mg eq. de quercetina/ mL de extrato)	0,50	21,4
	0,75	32,1
Cúrcuma	0,25	0,90
(16,3 mg de curcuminóides/ mL de extrato)	0,50	1,84
	0,75	2,76

5.3.1. Aspecto visual

Exemplos de imagens dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma estão apresentados na Figura 16. Os filmes contendo o extrato de erva baleeira (Figuras 16a, 16b, 16c) apresentaram um aumento gradual da coloração verde em função do aumento da concentração de extrato nas formulações. Também é possível verificar que nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg de flavonóides/ FDO os filmes apresentaram-se íntegros, mas com um aspecto bastante heterogêneo, possivelmente devido à separação de fases entre a solução filmogênica e o extrato incorporado (Figuras 16a e 16b). Na concentração de 0,75 mg de flavonóides/ FDO a separação de fases não foi verificada e o filme apresentou-se bastante homogêneo e com excelente integridade física.

Nos filmes contendo o extrato de cúrcuma (Figuras 16c, 16d, 16e), também houve um aumento da coloração amarela em função do aumento na concentração de extrato. Entretanto, as superfícies dos filmes, em todas as concentrações estudadas (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO), foram bastante homogêneas, íntegras fisicamente, não se verificando a separação de fases entre a solução filmogênica e o extrato.

Os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira também apresentaram uma superfície mais rugosa, enquanto os filmes incorporados com o extrato de cúrcuma apresentaram uma superfície bastante lisa. Essas diferenças estão provavelmente associadas às características intrínsecas aos extratos e também às concentrações utilizadas nas formulações, uma vez que o extrato de erva baleeira foi adicionado em uma concentração muito superior ao extrato de cúrcuma.

Figura 16. Exemplos dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma: (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO; (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO; (c) 0,75 mg de flavonóides/ FDO; (d) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO; (e) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO; (f) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.

5.3.2. Microscopia eletrônica de varredura

Comparando-se as micrografias do filme sem extrato (Figuras 17a, 17b) e dos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira (Figuras 17c – 17h), verificou-se uma nítida alteração tanto na superfície, quanto na estrutura interna dos filmes. À medida que a concentração de extrato aumentou, as superfícies dos filmes (Figuras 17c, 17e, 17g) tornaram-se menos compactas e muito heterogêneas. Nas imagens da fratura (Figuras 17d, 17f, 17h), também foi possível observar as irregularidades e depressões ocasionadas pela adição de extrato. Provavelmente estas alterações estão relacionadas com a incorporação do extrato na matriz e com possíveis interações entre flavonóides e as macromoléculas amido e HPMC.

Nos filmes incorporados com o extrato de cúrcuma, as imagens das superfícies (Figuras 18c, 18e, 18g) mostram que os filmes também apresentaram um aumento na heterogeneidade, principalmente na concentração de 0,75 mg de curcuminóides/ FDO. Na estrutura interna (Figuras 18d, 18f, 18h), verificou-se a formação de irregularidades e descontinuidades na matriz. O extrato de cúrcuma é menos solúvel em água, e tal característica pode ter promovido estas alterações em relação ao filme sem extrato (Figuras 18a, 18b).

Os filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma apresentaram características microestruturais distintas, sobretudo quanto à estrutura interna o que pode estar associado, primeiramente, ao fato de que o extrato de erva baleeira foi adicionado em uma concentração muito superior ao extrato de cúrcuma, visando atingir as concentrações de flavonóides. Outro fator refere-se à hidrofobicidade dos extratos, característica muito superior no extrato de cúrcuma. No entanto, como o extrato de cúrcuma foi adicionado em menor concentração, as alterações microestruturais foram menos evidentes e praticamente imperceptíveis visualmente, conforme já discutido.

Figura 17. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO): (a) 0 mg, imagem da superfície (1200x); (b) 0 mg, imagem da fratura (1500x) (c) 0,25 mg, imagem da superfície (300x); (d) 0,25 mg, imagem da fratura (1500x); (e) 0,50 mg, imagem da superfície (300x); (f) 0,50 mg, imagem da fratura (1500x); (g) 0,75 mg, imagem da superfície (300x); (h) 0,75 mg, imagem da fratura (1500x).

Figura 18. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura do filme de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO): (a) 0 mg, imagem da superfície (1200x); (b) 0 mg, imagem da fratura (1500x) (c) 0,25 mg, imagem da superfície (300x); (d) 0,25 mg, imagem da fratura (1500x); (e) 0,50 mg, imagem da superfície (300x); (f) 0,50 mg, imagem da fratura (1500x); (g) 0,75 mg, imagem da superfície (300x); (h) 0,75 mg, imagem da fratura (1500x).

5.3.3. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 19, encontram-se os espectros de infravermelho dos filmes de desintegração oral incorporados com o extrato de erva baleeira. Em relação ao filme sem extrato (80A:20HPMC), verificou-se que houve um deslocamento nas bandas de absorção de 3350 a 3304 cm^{-1} e de 1643 a 1603 cm^{-1} , à medida que a concentração de extrato aumentou na matriz polimérica.

O pico de absorção no comprimento de onda de 3350 cm^{-1} no filme sem extrato (80A:20HPMC) refere-se aos grupos hidroxilas provenientes do amido e da HPMC e, com a incorporação do extrato de erva baleeira nos filmes, houve um deslocamento deste pico, o que provavelmente se deve à incorporação na estrutura dos filmes dos grupamentos hidroxila provenientes dos flavonóides. Com a incorporação do extrato de erva baleeira, parte da água utilizada na formulação do filme sem extrato foi substituída, o que também provocou o deslocamento do pico 1643 cm^{-1} , que se refere ao estiramento O-H das moléculas de água ligadas às moléculas de amido. O pico 1515 cm^{-1} , presente apenas nos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira e mais evidente nas concentrações de 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO, refere-se ao estiramento C=C característico de moléculas aromáticas como os flavonóides (EDELMANN et al. 2001; SILVA et al., 20014; TARANTILIS et al., 2008), e demonstra a incorporação do extrato na matriz polimérica, bem como a maior interação entre extrato e matriz nas maiores concentrações de flavonóides. Nos demais picos de absorção dos espectros não foram observadas alterações relevantes que inferissem a possíveis alterações químicas nos filmes.

Figura 19. Espectros de infravermelho (FTIR) dos filmes de desintegração incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira: (1) 0 mg de flavonóides/ FDO, (2) 0,25 mg de flavonóides/ FDO, (3) 0,50 mg de flavonóides/ FDO, (4) 0,75 mg de flavonóides/ FDO.

Nos filmes incorporados com extrato de cúrcuma (Figura 20), o aumento na concentração de extrato também promoveu um ligeiro deslocamento da banda de absorção de 3350 para 3345 cm^{-1} , que possivelmente se deve à presença dos curcuminóides e mais especificamente à presença dos grupos hidroxila provenientes de suas estruturas químicas. O deslocamento dos picos entre 1643 a 1625 cm^{-1} , provavelmente também está associado à substituição de parte da água pelo extrato de cúrcuma na formulação dos filmes. Nos filmes

incorporados com o extrato de cúrcuma, observou-se o pico de 1514 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{C}=\text{C}$, característico de compostos aromáticos (EDELMANN et al. 2001; SILVA et al., 20014; TARANTILIS et al., 2008) como os curcuminóides. O novo pico indica a incorporação do extrato de cúrcuma na matriz, e assim como nos filmes com extrato de erva baleeira, esta banda de absorção tornou-se mais evidente nas concentrações de 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO, mostrando , possivelmente a maior interação entre extrato de matriz.

Embora os efeitos da incorporação dos extratos de erva baleeira e cúrcuma nos espectros dos filmes sejam similares, é bastante interessante destacar que a amplitude dos deslocamentos dos picos de absorção nos espectros dos filmes de cúrcuma foi menor do que nos filmes de erva baleeira, o que certamente está relacionado à diferença de concentração dos extratos utilizados nas formulações. Este resultado, possivelmente, também demonstra a maior interação entre o extrato de erva baleeira e a matriz polimérica à medida que a concentração de flavonóides aumentou, caracterizada visualmente pela maior homogeneidade do filme na concentração de 0,75 mg de flavonóides/ FDO e pelas alterações observadas na estrutura superficial e interna do mesmo, conforme discutido na microscopia.

No entanto, é possível observar que, apesar das variações observadas, os espectros do filme sem extrato e dos filmes incorporados com os extratos de erva baleeira (Figura 19) e cúrcuma (Figura 20) mantiveram o mesmo padrão de comportamento, o que indica que a matriz manteve sua integridade física e que os extratos encontram-se dispersos na mesma.

Figura 20. Espectros de infravermelho (FTIR) dos filmes de desintegração incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma: (1) 0 mg de curcuminóides/ FDO, (2) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO, (3) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, (4) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.

Outros autores também avaliaram, através da espectroscopia de infravermelho, as interações entre o princípio ativo e as matrizes poliméricas nos filmes de desintegração oral. Abu-Huwaij et al. (2007) compararam os espectros da lidocaína isolada e dos filmes de carbopol contendo lidocaína, e verificaram a interação entre o polímero e a droga, o que pode ter ocorrido através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.

Meher et al. (2013) verificaram, através dos espectros de FTIR, que em filmes à base de hidroxipropilmetil celulose incorporados com carvedilol, fármaco utilizado para o

tratamento de hipertensão arterial, não ocorreu nenhuma interação física ou química entre a droga e o polímero, uma vez que não se observaram mudanças significativas nos picos de absorção.

Govindasamy, Kesavan e Narasimha (2013) observaram através dos espectros que em filmes de HPMC, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona e etil celulose, contendo carbamazepina (antiepiléptico), a droga se manteve pura e íntegra nas formulações.

5.3.4. *Propriedades mecânicas*

A espessura e umidade dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma são apresentadas na Tabela 11. A incorporação do extrato de erva baleeira não alterou a espessura dos filmes nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg de flavonóides/ FDO, em relação ao filme sem extrato (0 mg de flavonóides/ FDO), mas aumentou significativamente a espessura na concentração de 0,75 mg de flavonóides/ FDO. A umidade nas concentrações de 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO também apresentou um aumento significativo devido à adição do extrato.

Para os filmes incorporados com o extrato de cúrcuma, não se verificou nenhuma alteração significativa na espessura dos filmes. Quanto à umidade, apenas na concentração de 0,75 mg de curcuminóides/ FDO verificou-se variação significativa em relação ao filme sem extrato. As alterações mais acentuadas referentes à espessura e umidade, observadas nos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira, devem-se, sobretudo, à maior concentração de extrato utilizada nas formulações (Tabela 10).

Tabela 11. Espessura e umidade dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração (mg/FDO)	Espessura (mm)	Umidade (g de água/ 100g de filme)
Erva baleeira	0	$0,060 \pm 0,004^b$	$8,5 \pm 0,1^c$
	0,25	$0,061 \pm 0,001^b$	$8,4 \pm 0,2^c$
	0,50	$0,063 \pm 0,003^b$	$10,4 \pm 0,5^b$
	0,75	$0,067 \pm 0,003^a$	$11,1 \pm 0,1^a$
Cúrcuma	0	$0,060 \pm 0,004^a$	$8,5 \pm 0,1^b$
	0,25	$0,059 \pm 0,005^a$	$8,5 \pm 0,04^b$
	0,50	$0,060 \pm 0,003^a$	$8,5 \pm 0,4^{ab}$
	0,75	$0,060 \pm 0,002^a$	$8,7 \pm 0,2^a$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Os resultados referentes à tensão na ruptura (T), alongação (%) e módulo elástico (ME) dos filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma estão apresentados na Tabela 12. Comparando-se os filmes com e sem extrato (0 mg de flavonóides/ FDO), verificou-se que a incorporação e o aumento da concentração de extrato de erva baleeira nas formulações promoveu alterações significativas nas propriedades mecânicas dos filmes, com redução da tensão de ruptura, aumento na porcentagem de alongação e consequentemente redução do módulo elástico. O extrato de erva baleeira, conforme mostrado nas micrografias (Figura 17), tornou os filmes menos compactos e heterogêneos, o que provavelmente se refletiu em suas propriedades mecânicas. Estes resultados indicam que o extrato de erva baleeira pode ter atuado como plastificante nos filmes, uma vez que reduziu a coesividade da

matriz e aumentou a mobilidade das cadeias poliméricas, o que provavelmente está associado à presença dos flavonóides.

A incorporação e o aumento da concentração do extrato de cúrcuma também promoveu alterações nas propriedades mecânicas dos filmes, com aumento significativo da tensão de ruptura nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, quando comparados ao filme sem extrato. No entanto, nestas concentrações a porcentagem de alongação não variou significativamente. Na concentração de 0,75 mg de curcuminóides/ FDO a tensão de ruptura não variou significativamente em relação ao filme sem extrato, mas aumentou significativamente em relação a porcentagem de alongação. O módulo elástico, entretanto, aumentou significativamente em função do aumento da concentração de extrato nos filmes. Conforme discutido anteriormente, o extrato de cúrcuma promoveu alterações microestruturais menos acentuadas (Figura 18), e, embora os filmes tenham se apresentado mais heterogêneos, a coesividade da matriz foi mantida, o que provavelmente promoveu variações de menor amplitude, embora significativas, nas propriedades mecânicas dos mesmos. Outro fator a ser considerado é que a concentração do extrato de cúrcuma foi inferior à do extrato de erva baleeira, o que também foi responsável por propriedades mecânicas tão distintas.

Tabela 12. Tensão na ruptura (T), alongação (E) e módulo elástico (ME) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração (mg/ FDO)	T (MPa)	E(%)	ME (MPa)
Erva baleeira	0	19,7 ± 1,7 ^a	2,1 ± 0,4 ^c	1030,0 ± 2,3 ^a
	0,25	10,8 ± 1,3 ^b	2,8 ± 0,6 ^c	784,8 ± 0,8 ^b
	0,50	3,7 ± 0,7 ^c	8,0 ± 1,3 ^b	204,2 ± 0,5 ^c
	0,75	2,3 ± 0,4 ^d	9,1 ± 1,4 ^a	147,0 ± 0,2 ^d
Cúrcuma	0	19,7 ± 1,7 ^b	2,1 ± 0,4 ^b	1030,0 ± 2,3 ^c
	0,25	21,1 ± 1,8 ^a	2,2 ± 0,4 ^b	1102,2 ± 1,0 ^b
	0,50	20,7 ± 2,5 ^a	2,3 ± 0,4 ^b	1174,1 ± 0,9 ^a
	0,75	18,9 ± 2,8 ^b	2,6 ± 0,5 ^a	1163,0 ± 1,0 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Em relação a outros estudos, Mishra e Amin (2009) verificaram que a adição de dicloridrato de cetirizina, um anti-histamínico usado para tratar sintomas de alergia e rinite alérgica, promoveu em filmes à base de HPMC redução da tensão na ruptura (9,07 MPa), aumento na porcentagem de alongação (8,55%) e redução do módulo elástico (162 MPa). Filmes de desintegração oral produzidos com dois tipos de HPMC e incorporados com cafeína apresentaram tensões na ruptura de 12,32 MPa e 11,08 MPa (GARSUCH; BREITKREUTZ, 2009).

Filmes à base dos polímeros HPMC e goma xantana, e incorporados com zolmitriptano, fármaco utilizado para o tratamento de enxaqueca, apresentaram valores entre 9,12 e 15,95 MPa para a tensão na ruptura que, segundo os autores (SHILEDAR et al., 2014), mostra que os filmes apresentaram boa resistência mecânica ao estresse que possam ser

submetidos durante o transporte e administração. Avachat et al. (2013) obtiveram para filmes à base do polímero carbopol 940 e benzoato rizatriptano (tratamento de dor de cabeça) tensões na ruptura que variaram de 11,2 a 19,31 MPa.

Estes resultados mostram como as propriedades mecânicas dos filmes de desintegração oral variam em função do tipo de matriz polimérica e do princípio ativo incorporado.

5.3.5. *Mucoadesividade in vitro*

Os efeitos da incorporação de diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO) na mucoadesividade dos filmes de desintegração oral podem ser visualizados na Figura 21. Tanto para o filme contendo o extrato de erva baleeira quanto para o filme incorporado com o extrato de cúrcuma, houve uma redução significativa da força mucoadesiva (N) em relação ao filme sem extrato (0 mg de flavonóides ou curcuminóides/ FDO). Nos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira, observou-se que o aumento na concentração de extrato também provocou uma redução significativa da força mucoadesiva das formulações 0,50 mg e 0,75 mg de flavonóides/ FDO em relação a concentração de 0,25 mg de flavonóides/ FDO, cujos valores variaram entre $0,29 \pm 0,04$ N e $0,17 \pm 0,04$ N. Para o extrato de cúrcuma, os filmes com diferentes concentrações de extrato (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO) não variaram significativamente entre si, com forças mucoadesivas entre $0,31 \pm 0,02$ N e $0,33 \pm 0,04$ N.

Figura 21. Efeito da concentração dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO) sobre a força mucoadesiva (N) dos filmes de desintegração oral. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Os diferentes mecanismos propostos para explicar a mucoadesividade como atração eletrostática, ligações de hidrogênio, ligações covalentes, molhabilidade e atrações físicas (Peh; Wong, 1999), estão associados à superfície dos filmes. Logo, conforme discutido na microscopia eletrônica de varredura, a incorporação dos extratos de erva baleeira e cúrcuma alteraram as características superficiais dos filmes, o que, certamente também se refletiu na mucoadesividade dos mesmos, reduzindo possivelmente as interações entre a mucosa e as matrizes poliméricas. De acordo com os resultados obtidos na espectroscopia de infravermelho (Figuras 19 e 20), possivelmente tenha ocorrido interação de grupamentos da matriz com os flavonóides e curcuminóides, o que também pode ter reduzido a possibilidade

de interação por ligações de hidrogênio entre a mucosa (pele de frango) e a matriz incorporada com os extratos.

Resultados semelhantes à mucoadesividade foram encontrados por outros autores em filmes de desintegração oral incorporados com diferentes princípios ativos. De acordo com Meher et al. (2013), filmes à base de HPMC contendo o fármaco carvedilol, usado para o tratamento de hipertensão arterial, apresentaram forças mucoadesivas que variaram entre 0,338 e 0,384 N. Pendekal e Tegginamat (2012) verificaram uma força mucoadesiva de 0,30 N em filmes produzidos com os polímeros Eudragit® e quitosana, contendo cloridrato de tizanidina (relaxante muscular). Jones et al. (2013) observaram que filmes de HPMC e Eudragit® contendo o antirretroviral didanosina apresentaram forças mucoadesivas que variaram de 2,184 N a 1,116 N. Govindasamy, Kesavan e Narasimha (2013) obtiveram forças mucoadesivas que variaram entre 0,278 e 0,479 N para filmes produzidos com HPMC, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona e etil celulose, contendo carbamazepina (antiepiléptico).

5.3.6. Tempo de desintegração *in vitro*

Os tempos de desintegração *in vitro* dos filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma são apresentados na Tabela 13. Os filmes contendo o extrato de erva baleeira apresentaram um aumento significativo do tempo de desintegração tanto em relação ao filme sem extrato (0 mg de flavonóides/ FDO) quanto em função do aumento da concentração de extrato na matriz, sendo que na concentração máxima (0,75 mg de flavonóides/ FDO), o aumento do tempo de desintegração foi de 59%.

Para os filmes incorporados com o extrato de cúrcuma, o tempo de desintegração também apresentou um aumento significativo em relação ao filme sem extrato (0 mg de curcuminóides/ FDO), no entanto, entre as diferentes concentrações não foram observadas variações significativas. Na concentração máxima (0,75 mg de curcuminóides/ FDO) o tempo de desintegração dos filmes apresentou um acréscimo de 23%.

Tabela 13. Tempo de desintegração *in vitro* dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração (mg / FDO)	Tempo (segundos)
Erva baleeira	0	20,6 ± 2,4 ^c
	0,25	22,1 ± 1,8 ^c
	0,50	28,0 ± 3,3 ^b
	0,75	32,8 ± 4,4 ^a
Cúrcuma	0	20,6 ± 2,4 ^b
	0,25	23,3 ± 2,6 ^a
	0,50	23,5 ± 3,5 ^a
	0,75	25,4 ± 3,3 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

O aumento do tempo de desintegração observado em ambos os filmes era esperado, principalmente, devido ao aumento na concentração de sólidos na matriz, uma vez que parte da água presente na formulação 80A:20HPMC foi substituída pelos extratos. Também é possível verificar que, nos filmes incorporados com extrato de erva baleeira, o aumento do tempo de desintegração foi muito mais efetivo do que nos filmes com extrato de cúrcuma.

Este resultado, certamente, está relacionado à diferença de concentração destes extratos nas formulações (Tabela 10) e também ao aumento significativo da espessura dos filmes proporcionado pela adição do extrato de erva baleeira (Tabela 11). Todavia, deve ressaltar que mesmo com a adição dos extratos, os filmes apresentaram tempos de desintegração inferiores a 35 segundos, caracterizando-os como filmes de desintegração oral rápida.

Outros autores também obtiveram resultados semelhantes. Garsuch e Breitreutz (2010) verificaram que a adição da cafeína como princípio ativo também aumentou o tempo de desintegração dos filmes à base de carboximetil celulose e nos filmes à base de hidroxipropilmetil celulose. Mishra e Amin (2009) também verificaram um aumento do tempo de desintegração dos filmes à base de HPMC devido à adição de dicloridrato de cetirizina.

5.3.7. Quantificação de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral e uniformidade das doses unitárias

As concentrações de flavonóides e curcuminóides, analisadas nas doses unitárias (6 cm²) dos filmes de desintegração oral, são apresentadas na Tabela 14. Comparando-se as concentrações teóricas e as reais, verificou-se que os resultados foram muito satisfatórios e atenderam ao esperado. As pequenas variações de concentração devem-se principalmente ao fato de que o filme não foi produzido em doses unitárias e sim em uma placa contínua de onde se retiraram as amostras. O processo de secagem também pode ter interferido devido à circulação de ar na estufa, ocorrendo uma distribuição não homogênea da solução filmogênica na placa, o que também acarreta as variações de espessura das doses unitárias e, conseqüentemente, a dispersão irregular do extrato na matriz.

Tabela 14. Concentração real de flavonóides (mg eq. de quercetina/ FDO) e curcuminóides (mg eq. de curcumina/FDO) nas doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com diferentes concentrações teóricas dos extratos de erva baleeira (0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração teórica	Concentração real
Erva baleeira (mg eq. de quercetina/ FDO)	0,25	0,27 ± 0,01
	0,50	0,53 ± 0,03
	0,75	0,77 ± 0,03
Cúrcuma (mg eq. de curcumina/ FDO)	0,25	0,27 ± 0,02
	0,50	0,54 ± 0,01
	0,75	0,76 ± 0,03

Segundo o teste de uniformidade das doses unitárias (Farmacopéia, 2010), foram calculados os valores de aceitação (VA), e os resultados estão apresentados na Tabela 15. O produto cumpre as normas estabelecidas, se o valor de aceitação calculado para as 10 unidades testadas não é superior a L1, cujo valor é 15. Verificou-se, portanto, que as doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporadas com os extratos de erva baleeira e cúrcuma, em todas as concentrações estudadas (0,25; 0,50 e 0,75 mg do princípio ativo/ FDO), apresentaram-se em concordância com o teste de uniformidade.

Tabela 15. Valores de aceitação (VA)^c das doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporadas com os extratos de erva baleeira e cúrcuma em diferentes concentrações (0,25; 0,50 e 0,75 mg do princípio ativo/ FDO).

Extrato	Princípio ativo	Dose declarada mg / FDO	X (%) ^a	VA	L ₁ ^b
		0,25	104	2,57	
Erva baleeira	Flavonóides	0,50	98	0,55	15
	(mg eq. de quercetina/FDO)	0,75	105	3,52	
		0,25	104	2,55	
Cúrcuma	Curcuminóides	0,50	102	0,62	15
	(mg eq. de curcumina/ FDO)	0,75	101,3	0,096	

^a porcentagem da dose declarada

^b valor fornecido pela Farmacopéia Brasileira (2010)

^c VA ≤ L1

5.3.8. Estudo da liberação *in vitro* de flavonóides e curcuminóides nos filmes de desintegração oral

O estudo de liberação dos flavonóides nas doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com o extrato de erva baleeira pode ser observado na Figura 22. O filme com a menor concentração de flavonóides (0,25 mg de flavonóides/ FDO), foi o que apresentou a maior liberação do princípio ativo, cerca de 83% no período de 90 minutos. O filme contendo 0,50 mg de flavonóides/ FDO obteve a liberação máxima de 75% em 90 minutos, e o filme com 0,75 mg de flavonóides/ FDO foi o que apresentou a menor capacidade de liberação do princípio ativo em meio aquoso, alcançando um valor de 61% aos 120 minutos. Estes resultados mostram que o aumento da concentração de flavonóides nas

doses unitárias reduziu a liberação destes compostos no meio aquoso, o que, possivelmente, possa estar associado ao aumento do tempo de desintegração dos filmes (Tabela 13) quando a concentração de extrato foi aumentada, conforme discutido anteriormente. Possivelmente também há uma redução da difusão do extrato no meio, à medida que se aumenta sua concentração, o que talvez reflita a maior interação entre extrato e matriz. Os resultados obtidos na espectroscopia de infravermelho (Figura 19) sugerem uma maior interação entre os flavonóides e a matriz polimérica, à medida que a concentração de extrato aumentou, e observados através dos deslocamentos dos picos de absorção. Outro fator importante a ser considerado é que a matriz é constituída principalmente de amido (80%), que não se solubiliza em meio aquoso e, portanto, interfere na liberação do princípio ativo.

Figura 22. Estudo da liberação *in vitro* dos flavonóides (%) em função do tempo (minutos) nas doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporadas com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).

Nos filmes incorporados com o extrato de cúrcuma (Figura 23), verificou-se que o filme com concentração de 0,25 mg de curcuminóides/ FDO apresentou a capacidade de liberação máxima de 43% aos 120 minutos de análise, e o filme com 0,50 mg de curcuminóides/ FDO o valor de 42% aos 150 minutos. Para o filme contendo 0,75 mg de curcuminóides/ FDO, a liberação máxima foi 66% aos 90 minutos. Diferentemente do resultado encontrado para os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira, o filme com a maior concentração do extrato de cúrcuma (0,75 mg de curcuminóides/ FDO) foi o que apresentou a maior capacidade de liberação de curcuminóides. Comparando-se estes resultados com o tempo de desintegração *in vitro* (Tabela 13), verificou-se que o filme com 0,75 mg de curcuminóides/ FDO foi o que apresentou o maior tempo de desintegração, mas foi também o que obteve a maior porcentagem de liberação do princípio ativo. Apresentando, portanto, um resultado distinto em relação ao filme com extrato de erva baleeira. A maior concentração do extrato de cúrcuma, possivelmente, tenha favorecido a solubilidade da matriz no meio aquoso, e consequentemente, a liberação do princípio ativo.

Também é interessante observar que, a liberação máxima de flavonóides (83%) foi muito superior à liberação máxima de curcuminóides (66%), e este resultado, certamente, está associado às características de solubilidade de cada extrato, uma vez que o extrato de erva baleeira é muito hidrofílico e o extrato de cúrcuma, extremamente hidrofóbico. As ligações estabelecidas entre o extrato de cúrcuma e a matriz polimérica também devem ser mais fortes que as estabelecidas com extrato de erva baleeira. Nesse caso, a matriz deveria se desintegrar completamente para que houvesse uma elevada liberação do princípio ativo no meio aquoso. Todavia, com já mencionado, a matriz é constituída principalmente de amido, que apresenta baixa solubilidade em água e se reflete na baixa capacidade de erosão do filme em função do tempo de análise.

Figura 23. Estudo da liberação *in vitro* dos curcuminóides (%) em função do tempo (minutos) nas doses unitárias dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporadas com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).

Os trabalhos desenvolvidos sobre filmes de desintegração oral, frequentemente, avaliam a capacidade de liberação dos princípios ativos, predominantemente drogas sintéticas, e mostram a influência da composição das matrizes. Ding e Nagarsenker (2008) verificaram que, em filmes de desintegração oral à base de hidroxipropilmetil celulose e goma xantana, a liberação máxima de triclosan (80 - 90%) ocorreu aproximadamente aos 40 minutos. Segundo Vasantha et al. (2011), filmes de desintegração oral produzidos a partir de diferentes combinações dos polímeros HPMC, Eudragit, PVA e Carbopol, contendo como princípio ativo o composto sulfato de salbutamol, utilizado para o tratamento de doenças pulmonares, apresentaram liberação superior a 80% da droga no período de 90 minutos.

Miro et al. (2013) observaram que, em filmes à base de PEO (óxido de polietileno) contendo TrA (triancinolona acetonida) a liberação máxima da droga em uma solução de saliva artificial foi de cerca de 20% em 30 minutos, no entanto, a adição de ciclodextrina à formulação dos filmes aumentou a taxa de liberação da droga e permitiu a completa liberação do TrA em 10 minutos. Jones et al. (2013) observaram que, em filmes de desintegração oral produzidos com os polímeros Eudragit (EUD) e HPMC, contendo a droga didanosina (DDI) na proporção de 1:1:10 (DDI:HPMC:EUD), a liberação da droga foi de cerca de 50% em 6 horas. Entretanto, na proporção de 1:0,5:5, 80% da didanosina foi liberada nos primeiros 15 minutos de análise, o que mostra como a liberação controlada da droga é influenciada pela composição da matriz polimérica.

5.4. Propriedades funcionais nos extratos e nos filmes

5.4.1. Atividade antioxidante in vitro

5.4.1.1. Sequestro dos radicais DPPH

A concentração do extrato de erva baleeira para se atingir 50% da atividade sequestrante dos radicais DPPH (EC50) foi de 0,029 mL de extrato/mL de solução (1,2 mg de extrato seco/ mL de solução). Para o extrato de cúrcuma a concentração do EC50 foi 0,026 mL de extrato/mL de solução (1,3 mg de extrato seco/mL de solução). As concentrações dos extratos para inibição de 50% do radical foram muito próximas, embora o extrato de cúrcuma estudado apresente uma concentração de curcuminóides (16,3 mg/ mL de extrato) muito superior à concentração de flavonóides (1,4 mg/ mL de extrato) do extrato de erva baleeira, o

que talvez indique que os flavonóides apresentam uma capacidade antioxidante superior aos curcuminóides, uma vez que a diferença na concentração do princípio ativo foi de 1064%.

Em relação à curva padrão, utilizando-se o antioxidante trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid), para o extrato de erva baleeira obteve-se $24,6 \pm 0,1$ $\mu\text{mol eq. de trolox/mL de extrato}$ ($616 \mu\text{mol eq. de trolox/g de extrato seco}$), e para o extrato de cúrcuma $32,7 \pm 0,5$ $\mu\text{mol eq. de trolox/mL de extrato}$ ($653,7 \mu\text{mol eq. de trolox/g de extrato seco}$). Estes resultados mostram que o extrato de cúrcuma apresentou uma capacidade de sequestro dos radicais DPPH 6% superior ao extrato de erva baleeira, embora este resultado não seja proporcional às concentrações de curcuminóides e flavonóides.

Os resultados da atividade antioxidante referentes aos filmes incorporados com extratos de erva baleeira e cúrcuma são apresentados na Tabela 16. A capacidade sequestrante dos filmes contendo o extrato de erva baleeira aumentou significativamente em função do aumento da concentração de flavonóides, cuja variação entre as diferentes concentrações utilizadas foi de cerca 7%. Para os filmes contendo o extrato de cúrcuma, o aumento na concentração de curcuminóides, de 0,25 mg/ FDO para 0,50 mg/ FDO, promoveu um aumento significativo na capacidade antioxidante, aproximadamente 78%. No entanto, de 0,50 mg para 0,75 mg, não houve diferença significativa, com um aumento de apenas 7%.

Tabela 16. Porcentagem (%) de inibição do radical DPPH pelos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração mg/ FDO	% de inibição	μmol eq. de trolox/FDO
Erva baleeira	0,25	69,6 ± 0,91 ^c	0,86 ± 0,02 ^c
	0,50	74,3 ± 1,83 ^b	0,93 ± 0,01 ^b
	0,75	79,8 ± 0,52 ^a	0,97 ± 0,01 ^a
Cúrcuma	0,25	37,0 ± 1,05 ^c	0,39 ± 0,02 ^c
	0,50	56,6 ± 0,51 ^b	0,63 ± 0,01 ^b
	0,75	60,7 ± 0,82 ^a	0,69 ± 0,01 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Comparando-se os resultados dos filmes em relação ao tipo de extrato utilizado, observou-se que os filmes contendo o extrato de erva baleeira apresentaram maior capacidade de sequestro dos radicais DPPH do que os filmes contendo o extrato de cúrcuma. Como a concentração de flavonóides e curcuminóides nos filmes foram mantidas constantes (0,25; 0,50 e 0,75 mg/ FDO), e considerando também os resultados obtidos para os extratos, pode-se inferir que os flavonóides apresentam capacidade antioxidante superior aos curcuminóides.

A perda de coloração da solução do radical DPPH está relacionada tanto à transferência de hidrogênio quanto à redução pela transferência de elétrons, o que pode contribuir para interpretações imprecisas da capacidade antioxidante. Outro fator é a acessibilidade estérica das moléculas na reação, que permite que moléculas pequenas tenham melhor acesso ao radical, e, conseqüentemente, apresentem uma maior capacidade antioxidante neste método (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O DPPH é um radical nitrogênio estável e que não apresenta nenhuma similaridade aos radicais peroxila altamente reativos e

envolvidos na peroxidação lipídica, o que significa que muitos antioxidantes que reagem rapidamente com estes radicais podem reagir lentamente ou mesmo serem inertes ao radical DPPH· (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Estes aspectos são extremamente importantes na análise dos resultados e na comparação entre os diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante das amostras.

5.4.1.2. Redução do reagente Folin-Ciocalteu

O extrato de erva baleeira apresentou $4,4 \pm 0,2$ mg eq. de ácido gálico/ mL de extrato, e o extrato de cúrcuma $20,6 \pm 0,8$ mg eq. de ácido gálico/ mL de extrato, o que revela que o extrato de cúrcuma apresentou uma capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu superior ao extrato de erva baleeira, possivelmente associada à maior concentração de curcuminóides em relação ao flavonóides.

Para os filmes produzidos com os extratos de erva baleeira e de cúrcuma (Tabela 17), verificou-se um aumento significativo na redução do reagente Folin-Ciocalteu em função do aumento da concentração de flavonóides e curcuminóides nos filmes. O que indica que maiores concentração dos princípios ativos promoveram aumento da capacidade redutora dos filme, ou seja, de sua atividade antioxidante.

Tabela 17. Capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu pelos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonoides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração (mg/ FDO)	mg eq. de ácido gálico/ FDO
Erva baleeira	0,25	$1,32 \pm 0,03^c$
	0,50	$1,81 \pm 0,07^b$
	0,75	$2,27 \pm 0,02^a$
Cúrcuma	0,25	$0,28 \pm 0,03^c$
	0,50	$0,38 \pm 0,01^b$
	0,75	$0,50 \pm 0,01^a$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Embora o extrato de cúrcuma tenha apresentado uma maior capacidade redutora em relação ao extrato de erva baleeira, os filmes com o extrato de cúrcuma apresentaram menor atividade em relação aos filmes com erva baleeira. Por exemplo, na concentração de 0,75 mg do princípio ativo/ FDO, a diferença de atividade entre os filmes com os extratos de erva baleeira e de cúrcuma foi de 354%. A concentração de flavonóides e curcuminóides foi a mesma nos filmes (0,25; 0,50 e 0,75 mg do princípio ativo/ FDO), o que sugere, novamente, que a capacidade antioxidante dos flavonóides foi superior à dos curcuminóides.

5.4.1.3. Determinação do poder redutor do ferro (FRAP)

A capacidade redutora do ferro para o extrato de erva baleeira foi de $44,8 \pm 2,4$ μmol eq. de trolox/mL de extrato e para o extrato de cúrcuma $65,4 \pm 2,7$ μmol eq. de trolox/mL de extrato. O que mostra, mais uma vez, a maior capacidade antioxidante do extrato de cúrcuma em relação ao extrato de erva baleeira.

Tabela 18. Determinação do poder redutor do ferro (FRAP) nos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração (mg/ FDO)	μmol eq. de trolox/ FDO
Erva baleeira	0,25	$8,58 \pm 0,63^c$
	0,50	$19,11 \pm 1,49^b$
	0,75	$30,37 \pm 2,87^a$
Cúrcuma	0,25	$0,87 \pm 0,09^c$
	0,50	$1,45 \pm 0,04^b$
	0,75	$2,12 \pm 0,19^a$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Para os filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e de cúrcuma, observou-se que o aumento na concentração dos princípios ativos (flavonóides e curcuminóides), também promoveu um aumento significativo da capacidade redutora do ferro, conforme pode

ser observado na Tabela 18. Além disso, assim como observado para os outros métodos de atividade antioxidante discutidos anteriormente, os filmes incorporados com o extrato erva baleeira apresentaram maior atividade em relação aos filmes com extrato de cúrcuma, o que se deve possivelmente a uma maior atividade dos flavonóides em relação aos curcuminóides, conforme já discutido.

O mecanismo predominante neste método é a transferência de elétrons, logo, não é capaz de detectar compostos que atuem por transferência de hidrogênio, o que se refletiria em resultados subestimados. No entanto, em combinação com outros métodos pode ser útil na identificação de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Deve-se destacar também que, frequentemente, os valores obtidos pelo método FRAP tem uma baixa correlação com outros métodos antioxidantes, e, como a análise mede somente a capacidade redutora baseada no íon ferro, não é relevante fisiologicamente (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). Comparando-se os resultados obtidos pelos três métodos, percebe-se que de fato há uma maior correspondência entre os métodos de sequestro dos radicais DPPH e a redução do reagente Folin-Ciocalteu. Mas, apesar das diferenças em relação à quantificação, verificou-se em todos os métodos, inclusive no FRAP, que o extrato de cúrcuma e os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira apresentaram sempre a maior capacidade antioxidante.

5.4.1.4. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC)

O extrato de erva baleeira obteve para a capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) o resultado de $133,5 \pm 8,0$ $\mu\text{mol eq. de trolox/mL de extrato}$ ($3337,3 \pm 199,7$ $\mu\text{mol eq. de trolox/g de extrato seco}$), e o extrato de cúrcuma o valor de $441,3 \pm 29,5$ $\mu\text{mol eq. de trolox/mL de extrato}$ ($8825,4 \pm 590,3$ $\mu\text{mol eq. de trolox/g de extrato seco}$). Estes resultados demonstram que o extrato de cúrcuma apresentou uma maior capacidade de absorção de radicais oxigênio do que o extrato de erva baleeira.

Os resultados da capacidade de absorção de radicais oxigênio para os filmes incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma são apresentados na Tabela 19. Para os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira, houve um aumento significativo da capacidade antioxidante em função do aumento da concentração de flavonóides nos filmes. Os filmes contendo o extrato de cúrcuma também apresentaram maior capacidade de absorção de radicais oxigênio em função do aumento da concentração de curcuminóides, mas apresentaram menor atividade antioxidante quando comparados aos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira.

Conforme discutido anteriormente, a diferença entre a capacidade antioxidante entre os filmes de cúrcuma e de erva baleeira deve-se, possivelmente, à maior atividade dos flavonóides em relação aos curcuminóides.

Tabela 19. Capacidade de absorção de radicais oxigênio (ORAC) nos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (mg de curcuminóides/ FDO).

Extrato	Concentração (mg/ FDO)	$\mu\text{mol eq. de trolox/ FDO}$
Erva baleeira	0,25	$17,6 \pm 0,8^c$
	0,50	$28,2 \pm 0,9^b$
	0,75	$63,7 \pm 3,2^a$
Cúrcuma	0,25	$2,8 \pm 0,2^c$
	0,50	$4,8 \pm 1,1^b$
	0,75	$10,5 \pm 1,4^a$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

A capacidade de absorção dos radicais peroxila ($\text{ROO}^\cdot$) pelos extratos de erva baleeira e cúrcuma, assim como pelos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos, é um resultado bastante interessante, pois estes radicais, formados durante as reações em cadeia de oxidação lipídica, são comumente encontrados em amostras de alimentos e sistemas biológicos, apresentando efeitos nocivos à saúde, além de estarem associados à deterioração da qualidade dos alimentos (MAGALHÃES et al., 2008).

5.4.2. Atividade antimicrobiana

Os extratos de erva baleeira e cúrcuma não apresentaram atividade inibitória contra a bactéria *Streptococcus mutans*, uma vez que não foram observados os halos de inibição ao redor dos discos contendo os extratos, conforme pode ser observado na Figura 24B. O filme

de desintegração oral sem adição de extrato (80A:20HPMC), utilizado como controle negativo, também não apresentou capacidade antimicrobiana, com crescimento da bactéria sobre o filme (Figura 24A). O antibiótico cloranfenicol, utilizado como controle positivo, apresentou elevada capacidade de inibição da bactéria *Streptococcus mutans*, com um diâmetro de aproximadamente 10 mm (Figura 24A).

Os filmes de desintegração oral incorporados com o extrato de cúrcuma (Figura 24D) também não apresentaram a formação de halo de inibição ao redor dos discos dos filmes em nenhuma das concentrações estudadas (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO). No entanto, na superfície dos filmes não houve crescimento microbiano.

Os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira nas concentrações de 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO apresentaram capacidade inibitória contra *Streptococcus mutans*, observando-se os halos de inibição ao redor dos filmes (Figura 24C). Na concentração de 0,25 mg de flavonóides / FDO, não houve formação de halo de inibição, mas também não ocorreu crescimento da bactéria na superfície do filme (Figura 24C).

Figura 24. Atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans*: A - (a) filme de desintegração oral sem extrato (80A:20HPMC), (b) controle positivo (antibiótico cloranfenicol); B - (a) extrato de cúrcuma, (b) extrato de erva baleeira; C - (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO, (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO, (c) 0,75 mg de flavonóides/ FDO; D - (a) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO, (b) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, (c) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.

Deve-se destacar que o fato do extrato de erva baleeira puro não ter apresentado a formação de um halo de inibição possa estar associado à baixa difusão do extrato no ágar, o que foi favorecida quando o papel de filtro foi substituído pela matriz polimérica. A atividade antimicrobiana negativa para o extrato de cúrcuma também pode estar associada à hidrofobicidade característica do extrato, o que não permitiu a difusão do mesmo no ágar. Os

resultados obtidos para os extratos de erva baleeira e cúrcuma sugerem que, talvez, o método da difusão em ágar não tenha sido o mais adequado para os extratos.

Quanto à atividade anti-fúngica, os extratos de erva baleeira e cúrcuma apresentaram capacidade inibitória contra o fungo *Candida albicans* (Figura 25B). Todavia, o filme de desintegração oral sem extrato (Figura 25A), utilizado como controle negativo, e os filmes incorporados com os extratos de erva baleeira (Figura 25C) e cúrcuma (Figura 25D) não apresentaram nenhuma atividade antimicrobiana contra a cândida. Tanto nos filmes contendo o extrato de erva baleeira, quanto nos filmes contendo o extrato de cúrcuma, observou-se o crescimento do fungo sobre a superfície dos mesmos. Apesar dos extratos terem apresentado capacidade anti-fúngica, os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos não apresentaram tal propriedade, o que, certamente, esteja associado à concentração dos extratos nos filmes, não atingindo a concentração inibitória mínima contra a *Candida albicans*.

Figura 25. Atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*: A - filme de desintegração oral sem extrato (80A:20HPMC); B – (a) extrato de erva baleeira, (b) extrato de cúrcuma; C – (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO, (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO, (c) 0,75 mg de flavonóides/ FDO; D - (a) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO, (b) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, (c) 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.

Koo et al (2000) observaram que o extrato etanólico de própolis apresentou atividade inibitória contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*, com halos de inibição de 2,00 mm e 0,83 mm, respectivamente. No entanto, o extrato etanólico de arnica não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e *Candida albicans*.

Hu, Huang e Chen (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana da curcumina contra *S. mutans* através da concentração mínima inibitória (MIC) e encontraram a concentração

antibacteriana de 125 $\mu\text{mol/L}$. A curcumina também apresentou a capacidade de redução da formação de biofilme pela bactéria, apresentando assim características anticariogênicas.

Pandit et al. (2011) verificaram que os curcuminóides apresentaram efeito inibitório sobre as propriedades de virulência dos biofilmes de *S. mutans*, como aderência e acidogenicidade, o que sugere que estes compostos poderiam ser utilizados no controle da formação de cáries.

Dinge e Nagarsenker (2008) estudaram a atividade antimicrobiana de filmes de HPMC contendo triclosan contra *Streptococcus mutans*, obtendo diâmetros de inibição que variaram entre 4,67 mm e 6,83 mm. Jug et al (2012) também verificaram a atividade antibacteriana contra *Streptococcus mutans* de comprimidos de desintegração oral à base de pectina e carbopol aditivados com triclosan.

Abruzzo et al. (2012) verificaram que filmes de desintegração oral à base de quitosana e gelatina incorporados com hidrocloreto de propranolol também não apresentaram atividade inibitória contra *Candida albicans*.

Os produtos naturais continuam sendo uma fonte inexplorada e potencialmente eficaz de moléculas com capacidade antimicrobiana e que poderiam ser utilizadas em terapias alternativas anticárie ou ainda como adjuvantes de substâncias já utilizadas, visando o aumento do efeito terapêutico. No entanto, projetos com abordagens multidisciplinares e a padronização e caracterização dos produtos naturais são de fundamental importância para o desenvolvimento de novos e eficazes métodos anticáries (JEON et al., 2011). Logo, a capacidade inibitória contra *Streptococcus mutans* dos filmes incorporados com extrato de erva baleeira, mostra uma boa perspectiva da utilização de produtos naturais nas terapias anticárie.

5.4.3. Atividade anti-inflamatória

Os resultados da avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato de erva baleeira e dos filmes incorporados com o extrato são apresentados na Tabela 20. O extrato puro (diluição 1:10) apresentou uma elevada inibição da enzima COX-2 (90,5%), o que demonstra o potencial anti-inflamatório da planta estudada e ainda corrobora com os resultados anteriormente apresentados por outros autores.

Sertié et al. (2005) verificaram a capacidade anti-inflamatória do extrato liofilizado das folhas de erva baleeira (*Cordia verbenacea*), administrado topicamente (6,0 mg/kg de peso) e oralmente (2,48 mg/kg de peso) em modelos animais. Passos et al. (2007) observaram a redução do edema de pata em ratos tratados com o óleo essencial de *Cordia verbenacea*, em concentrações entre 300 e 600 mg/kg de peso. Entretanto, o óleo essencial não apresentou capacidade de inibição das enzimas COX-1 e COX-2 nos testes in vitro.

Fernandes et al. (2007) analisaram as propriedades anti-inflamatórias dos compostos α -humuleno e trans-cariofileno, isolados do óleo essencial de *Cordia verbenacea* e concluíram que ambos os compostos reduziram a produção de prostaglandina E₂, bem como a expressão da enzima COX-2 em ratos. Além disso, os efeitos anti-inflamatórios destes compostos foram comparáveis àqueles observados em animais tratados com dexametasona.

Parisotto et al. (2012) estudaram a atividade antitumoral dos extratos de *Cordia verbenacea*, e verificaram in vitro a capacidade de redução da expressão de COX-2 em células tumorais por extratos obtidos por fluido supercrítico. Segundo os autores, a atividade antitumoral observada in vivo foi provavelmente causada pela inibição da enzima COX-2.

Os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira também apresentaram alta capacidade inibitória da COX-2 em todas as concentrações estudadas, além do, que foi

possível verificar que o aumento da concentração de flavonóides nos filmes e, conseqüentemente, o aumento da concentração de extrato promoveu uma maior capacidade anti-inflamatória. O anti-inflamatório dexametasona, utilizado como controle positivo, apresentou uma inibição de 47,2% da enzima COX-2, o que significa que, em relação ao extrato e aos filmes de erva baleeira, sua atividade anti-inflamatória foi bastante inferior.

Tabela 20. Atividade anti-inflamatória do extrato de erva baleeira e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato (mg de flavonóides/FDO) através da inibição da enzima COX-2 (%).

Amostra		% de inibição de COX-2
Dexametasona (mg)	0,50	47,2
Extrato de erva baleeira	Diluição 1:10	90,5 ± 1,0
Filmes	0,25	71,0 ± 1,5 ^c
(mg de flavonóides/ FDO)	0,50	80,8 ± 2,5 ^b
	0,75	87,5 ± 0,8 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

O extrato de cúrcuma (diluição 1:10) apresentou uma inibição de 18% da enzima COX-2 (Tabela 21), demonstrando uma baixa capacidade anti-inflamatória, quando comparado ao extrato de erva baleeira. Entretanto, quando analisado sem diluição, o extrato de cúrcuma apresentou uma inibição de 86,1%. Outros estudos também demonstram o potencial anti-inflamatório da cúrcuma e de seus componentes principais. Ramsewak et al. (2000) verificaram que a curcumina, demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, na

concentração de 125 mg/mL, apresentaram inibição de 89,7%, 82,5% e 58,9%, respectivamente, da enzima COX-2.

Segundo Kloesch et al. (2013), a curcumina apresenta elevada propriedade anti-inflamatória e também induz a apoptose de células associadas ao desenvolvimento de artrite reumatoide. Para os autores, este resultado sugere a possibilidade de uso da curcumina como um remédio natural para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas como a artrite reumatóide, embora ainda haja a necessidade de estudos relacionados ao mecanismo molecular da curcumina.

Os filmes de desintegração oral incorporados com o extrato de cúrcuma apresentaram inibições da enzima COX-2 que variaram entre 27,6 e 28,1%, e também foram menos efetivos na capacidade anti-inflamatória do que os filmes contendo o extrato de erva baleeira. Também é possível verificar que o aumento da concentração de extrato (curcuminóides) nos filmes também não afetou significativamente a inibição de COX-2. Como verificado anteriormente, como o extrato de erva baleeira apresenta maior capacidade anti-inflamatória do que o extrato de cúrcuma, em função das diluições analisadas, talvez fosse necessária uma maior concentração do extrato de cúrcuma nos filmes para se atingir inibições similares aos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira. Comparando-se estes resultados com o resultado obtido para a dexametasona, verifica-se que, em relação ao extrato de cúrcuma não diluído (86,1%), a dexametasona (47,2%) foi também menos efetiva na inibição da enzima COX-2, mas apresentou maior atividade anti-inflamatória quando comparada aos filmes incorporados com o extrato de cúrcuma.

Tabela 21. Atividade anti-inflamatória do extrato de cúrcuma e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (mg de curcuminóides/FDO) através da inibição da enzima COX-2 (%).

Amostra		% de inibição de COX-2
Dexametasona (mg)	0,50	47,2
Extrato de cúrcuma	Diluição 1:10	20,6 ± 3,0
	Sem diluição	86,1 ± 1,0
Filmes	0,25	27,6 ± 1,2 ^a
(mg de curcuminóides /FDO)	0,50	27,7 ± 1,2 ^a
	0,75	28,1 ± 1,4 ^a

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

5.5. Estabilidade

5.5.1. Extratos de erva baleeira e cúrcuma

Para o extrato de erva baleeira não foram verificadas diferenças significativas na concentração de flavonóides (mg eq. de quercetina/ mL de extrato) em função do tempo de armazenamento, nas temperaturas de 25°C e 40°C (Figura 26). Estes resultados mostraram a boa estabilidade do extrato, tanto na temperatura ambiente, quanto em condições de temperatura elevada. Na temperatura de 25°C a concentração de flavonóides totais variou de 1,41 a 1,45 mg eq de quercetina/ mL de extrato, e na temperatura de 40°C variou de 1,40 a 1,41 mg eq de quercetina/ mL de extrato. Não foram encontrados na literatura estudos de estabilidade do extrato de erva baleeira.

Figura 26. Efeito do tempo de armazenamento (90 dias) na concentração de flavonóides (mg eq. de quercetina/ mL de extrato) do extrato de erva baleeira acondicionado nas temperaturas de 25°C e 40°C. (Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento do extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.)

Os resultados referentes ao estudo de estabilidade do extrato de cúrcuma estão apresentados na Figura 27. Na temperatura de 25°C, a concentração de curcuminóides nos extratos acondicionados por 40, 60 e 90 dias variou significativamente em relação ao tempo inicial (0 dias), obtendo-se valores entre 16,3 a 15,1 mg eq. de curcumina/ mL de extrato. Na temperatura de 40°C, verificou-se o decréscimo significativo na concentração de curcuminóides nos extratos armazenados por 20, 40, 60 e 90 dias, com resultados que variaram entre 16,3 e 12,4 mg eq. de curcumina/ mL de extrato. Estes resultados mostram que o extrato de cúrcuma apresentou-se mais susceptível à variação da temperatura de armazenamento, com uma redução de 24% no teor de curcuminóides ao final do período de armazenamento na temperatura de 40°C.

Figura 27. Efeito do tempo de armazenamento (90 dias) na concentração de curcuminóides (mg eq de curcumina/ mL de extrato) do extrato de cúrcuma acondicionado nas temperaturas de 25°C e 40°C. (Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento do extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.)

5.5.2. Filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma

As concentrações de flavonóides (mg eq. de quercetina/ FDO) em função do tempo de armazenamento, nas condições de 25°C e 60% de umidade relativa, nos filmes de desintegração oral incorporados com o extrato de erva baleeira são apresentadas na Figura 28. Em todas as concentrações analisadas verificou-se a estabilidade da concentração de flavonóides nos filmes em função do tempo de armazenamento, com variações entre 0,25 e 0,27 mg eq de quercetina/ FDO; 0,49 e 0,53 mg eq de quercetina/ FDO e 0,72 e 0,77 mg eq.

de quercetina/ FDO. Os filmes de desintegração oral também mantiveram sua integridade física, durante o armazenamento, em todas as concentrações estudadas.

Figura 28. Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (25°C - 60% UR) na concentração de flavonóides (mg eq. de quercetina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO). (Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento dos filmes de desintegração oral. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.)

Nos filmes armazenados à 40°C e 75% de umidade relativa, também verificou-se a estabilidade da concentração de flavonóides nos filmes de desintegração oral em função do tempo de armazenamento (Figura 29). Para cada concentração foram observadas as seguintes variações: 0,26 a 0,28 mg eq. de quercetina/ FDO; 0,47 a 0,54 mg eq. de quercetina/ FDO e 0,72 a 0,77 mg eq. de quercetina/ FDO. Entretanto, apesar da estabilidade dos flavonóides, os filmes perderam sua integridade física, devido à absorção de umidade do ambiente, pois

foram armazenadas sem qualquer tipo de embalagem, visando avaliar o comportamento dos mesmos em condições adversas de umidade e temperatura.

É importante ressaltar que a estabilidade dos flavonóides observada no extrato de erva baleeira puro (Figura 26), nas temperaturas de 25°C e 40°C, foi mantida quando o mesmo foi incorporado aos filmes de desintegração oral, que além de submetidos à mesma variação de temperatura foram avaliados quanto à exposição em diferentes umidades relativas (60% e 75%).

Figura 29. Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (40°C - 75% UR) na concentração de flavonóides (mg eq de quercetina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de erva baleeira (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO). (Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento dos filmes de desintegração oral. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.)

Para os filmes incorporados com o extrato de cúrcuma, a estabilidade da concentração de curcuminóides (mg eq. de curcumina/ FDO) em função do tempo de armazenamento, nas

condições de 25°C e 60% de umidade relativa, é apresentada na Figura 30. Para cada concentração foram observadas as seguintes variações: entre 0,25 e 0,27 mg eq. de curcumina/FDO; 0,50 e 0,54 mg eq. de curcumina/ FDO e 0,73 e 0,77 mg eq. de curcumina/FDO. Assim como no extrato de cúrcuma puro a 25°C (Figura 27), a concentração de curcuminóides foi mantida em função do tempo de armazenamento, embora nos filmes a variabilidade da concentração tenha sido inferior quando comparada ao extrato puro.

Figura 30. Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (25°C - 60% UR) na concentração de curcuminóides (mg eq. de curcumina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (0,25, 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO). (Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento dos filmes de desintegração oral. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.)

Nas condições de armazenagem de 40°C e 75% de umidade relativa (Figura 31), as variações na concentração de curcuminóides dos filmes foram de 0,20 a 0,27 mg eq. de

curcumina/ FDO; 0,48 a 0,55 mg eq. de curcumina/ FDO e 0,73 e 0,78 mg eq. de curcumina/ FDO. Este resultado é bastante interessante, pois além de mostrar a estabilidade de curcuminóides na matriz polimérica, mostra que o extrato de cúrcuma incorporado aos filmes de desintegração oral apresentou uma estabilidade superior ao extrato de cúrcuma puro armazenado na temperatura de 40°C (Figura 27), conforme discutido anteriormente.

Figura 31. Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (40°C - 75% UR) na concentração de curcuminóides (mg eq. de curcumina/ FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato de cúrcuma (0,25, 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO). (Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tempos de armazenamento dos filmes de desintegração oral. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.)

Logo, a matriz polimérica teve um papel importante na conservação dos flavonóides e, principalmente, dos curcuminóides, que se mostraram mais susceptíveis a temperaturas elevadas. Também é importante destacar a integridade física dos filmes contendo o extrato de

cúrcuma em ambas as condições estudadas (25° - 60% UR, 40°C – 75% UR), o que mostra a menor interferência da umidade na estabilidade dos mesmos, quando comparados aos filmes com extrato de erva baleeira. Possivelmente, isto se deva ao fato de que o extrato de cúrcuma, devido à sua hidrofobicidade, torne a matriz polimérica menos higroscópica, e assim menos susceptível às variações de umidade.

Outros estudos também avaliaram a estabilidade dos filmes de desintegração oral em função do tempo de armazenamento e em diferentes condições de umidade e temperatura. Ding e Nagarsenker (2008) analisaram a estabilidade durante 90 dias, sob as condições de estocagem de 30°C - 60% de umidade relativa e 40°C – 75% de umidade relativa, de filmes à base de HPMC contendo triclosan e verificaram que as amostras não apresentaram mudança na aparência, perda de massa e nem alteração do conteúdo de triclosan.

Filmes à base de celulose microcristalina, hidroxipropilmetil celulose, e hidroxipropil celulose contendo proclorperazina apresentaram-se estáveis quanto ao conteúdo da droga, por 8 semanas em condições de 40°C e 75% de umidade relativa (Nishimura et al., 2009).

Govindasamy, Kesavan e Narasimha (2013) verificaram que filmes produzidos com HPMC, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona e etil celulose, contendo carbamazepina (antiepiléptico) e armazenados a 37°C e 75% de umidade relativa, durante 6 meses, apresentaram conteúdo similar da droga em relação ao tempo inicial.

5.5.3. Atividade anti-inflamatória

A avaliação da estabilidade da atividade anti-inflamatória do extrato de erva baleeira e dos filmes de desintegração oral incorporados com o extrato, nas diferentes condições de armazenagem (25°C - 60% UR, 40°C - 75% de UR) é apresentada nas Figuras 32 e 33. O

extrato de erva baleeira armazenado nas temperaturas de 25°C e de 40°C manteve sua atividade anti-inflamatória, apresentando apenas pequenas variações no período analisado. A estabilidade do extrato de erva baleeira quanto ao teor de flavonóides (Figura 26), discutida anteriormente, possivelmente também se refletiu na manutenção de sua capacidade anti-inflamatória. Este resultado é muito importante, uma vez que mostra a estabilidade funcional do extrato armazenado em uma temperatura relativamente elevada.

Quanto aos filmes de desintegração oral incorporados com o extrato de erva baleeira, observou-se que nas concentrações de 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO, a atividade anti-inflamatória também foi mantida ao longo do tempo de armazenamento nas duas condições de temperatura e umidade estudadas. Este resultado possivelmente está associado à estabilidade dos flavonóides nestes filmes durante o período de estocagem (Figuras 28 e 29) e também à maior interação entre matriz e o extrato, conforme apresentado na espectroscopia de infravermelho, que deve ter um importante papel na manutenção desta propriedade funcional do extrato incorporado.

Entretanto, na concentração de 0,25 mg de flavonóides/ FDO, o filme apresentou decréscimos de aproximadamente 30% e 55% nas condições de 25°C-60%UR e 40°C-75%, respectivamente, ao final do período de armazenamento. Nesta concentração de princípio ativo no filme, embora tenha sido observada a estabilidade dos flavonóides nas duas condições de armazenagem, a atividade anti-inflamatória teve um comportamento distinto. Talvez, como a interação entre matriz e extrato nesta concentração tenha sido menor, conforme sugerido nos resultados do FTIR, a matriz tenha exercido um papel menos efetivo na proteção de outros componentes do extrato de erva baleeira que também apresentem ação anti-inflamatória.

Figura 32. Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (25°C - 60% UR) na atividade anti-inflamatória (% de inibição de COX-2) do extrato de erva baleeira e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).

Figura 33. Efeito do tempo (90 dias) e das condições de armazenamento (40°C - 75% UR) na atividade anti-inflamatória (% de inibição de COX-2) do extrato de erva baleeira e dos filmes de desintegração oral incorporados com diferentes concentrações do extrato (0,25, 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO).

5.6. Avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma

As doses unitárias (FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira (0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO) que foram avaliados sensorialmente estão apresentados na Figura 34. Os resultados do teste aceitação dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma são apresentados na Tabela 22.

Figura 34. Doses unitárias (FDO) dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira: (a) 0,25 mg de flavonóides/ FDO; (b) 0,50 mg de flavonóides/ FDO; 0,75 mg de flavonóides/ FDO; e cúrcuma: : (a) 0,25 mg de curcuminóides/ FDO; (b) 0,50 mg de curcuminóides/ FDO; 0,75 mg de curcuminóides/ FDO.

Para os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira, o atributo aparência obteve médias entre o indiferente e o gostei ligeiramente, avaliação relacionada principalmente à cor dos filmes. Quanto ao conforto, atributo descrito como a conveniência na forma de administração e rapidez de desintegração dos filmes, as médias dos provadores ficou entre o desgostei ligeiramente e o indiferente. O atributo sensação, associado à existência ou não de resíduos após a administração dos filmes obteve médias entre o desgostei regularmente e o desgostei ligeiramente. Em relação ao sabor, os filmes de desintegração oral obtiveram médias muito baixas, entre o desgostei muito e o desgostei regularmente, o que, certamente, é reflexo do sabor amargo dos filmes característico do extrato de erva baleeira. As avaliações dos atributos conforto e sensação, possivelmente, foram afetadas pelo sabor dos filmes, uma vez que o intenso amargor dificultou a avaliação do tempo de desintegração e promoveu um elevado gosto residual. A aceitação global dos filmes obteve médias entre o desgostei regularmente e o desgostei ligeiramente, o que demonstra a baixa aceitação dos filmes pelos provadores. Quanto à diferença na concentração de extrato nos filmes, somente os atributos aparência e sabor apresentaram diferenças significativas. À medida que se aumentou a concentração de extrato, houve intensificação da cor verde escuro e do amargor, o que desagradou aos provadores, promovendo tais diferenças nestes atributos.

Os provadores também foram questionados sobre a possibilidade de compra dos filmes, ressaltando-se suas propriedades funcionais (antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória). De acordo com os resultados, na concentração de 0,25 mg de flavonóides/FDO, 36% dos provadores comprariam; para a concentração de 0,50 mg de flavonóides/FDO, 24% dos provadores responderam afirmativamente e na concentração de 0,75 mg de flavonóides/FDO, apenas 20% dos provadores comprariam o produto. Em todas as concentrações analisadas, os comentários dos provadores foram recorrentes e referiram-se principalmente ao sabor muito amargo dos filmes e ao elevado e persistente gosto residual.

Também foi destacada a possibilidade da adição de adoçantes e de compostos aromáticos, com o objetivo de mascarar o amargor. Este resultado foi esperado, uma vez que o extrato de erva baleeira utilizado na produção dos filmes encontra-se concentrado e apresenta acentuado sabor amargo, o que se refletiu no sabor dos filmes bioativos.

Tabela 22. Médias dos atributos aparência, conforto, sabor, sensação e aceitação global obtidas na avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral (FDO) incorporados com diferentes concentrações dos extratos de erva baleeira (0,25; 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/ FDO) e cúrcuma (0,25; 0,50 e 0,75 mg de curcuminóides/ FDO).

Filme		Atributos			
Erva baleeira	Aparência	Conforto	Sabor	Sensação	Aceitação
0,25	$5,9 \pm 1,6^a$	$4,9 \pm 1,7^a$	$2,9 \pm 1,8^a$	$4,0 \pm 1,9^a$	$3,8 \pm 1,9^a$
0,50	$5,4 \pm 1,7^{ab}$	$4,6 \pm 2,0^a$	$2,5 \pm 1,3^{ab}$	$3,6 \pm 1,8^a$	$3,4 \pm 1,6^a$
0,75	$4,8 \pm 1,9^b$	$4,2 \pm 2,0^a$	$2,2 \pm 1,3^b$	$3,4 \pm 1,8^a$	$3,2 \pm 1,6^a$
Cúrcuma					
0,25	$7,0 \pm 1,4^a$	$6,4 \pm 1,9^a$	$5,2 \pm 1,8^a$	$6,5 \pm 1,7^a$	$6,0 \pm 1,9^a$
0,50	$7,0 \pm 1,4^a$	$5,9 \pm 1,8^a$	$4,8 \pm 1,6^{ab}$	$5,5 \pm 1,9^b$	$5,5 \pm 1,8^{ab}$
0,75	$6,3 \pm 1,6^b$	$5,6 \pm 1,8^a$	$4,3 \pm 1,9^b$	$5,2 \pm 1,9^b$	$4,9 \pm 1,8^b$

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as formulações dos filmes de desintegração oral com extrato. Diferença entre as médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Para os filmes de desintegração oral incorporados com extrato de cúrcuma, a aparência obteve médias entre o gostei ligeiramente e o gostei regularmente. Para o conforto, as médias ficaram entre o indiferente e o gostei regularmente, o que demonstra que a maior concentração de extrato promoveu um maior tempo de desintegração dos filmes na boca. Em

relação ao sabor, as médias variaram entre o desgostei ligeiramente e o indiferente, e para a sensação, obtiveram-se médias entre o indiferente e o gostei ligeiramente. Assim como nos filmes com extrato de erva baleeira, o aumento na concentração do extrato de cúrcuma nos filmes também desagradou aos provadores quanto ao sabor, o que se refletiu na sensação, atributo relacionado ao gosto residual dos filmes. A aceitação dos filmes de cúrcuma obteve médias entre o indiferente e o gostei ligeiramente, o que demonstra uma aceitação satisfatória do produto.

Quanto à intenção de compra do produto, 76% dos provadores (38) comprariam o filme na concentração de 0,25 mg de curcuminóides, destacando-se a rápida desintegração na boca e a interessante aplicação dos filmes para liberação de fármacos. No entanto, alguns provadores relataram que o sabor estava pouco evidente, e sugeriram a incorporação de compostos aromáticos. Na concentração de 0,50 mg de curcuminóides/ FDO, 60% dos provadores (30) comprariam os filmes, entretanto sugeriram a utilização de um adoçante na formulação e destacaram a presença de sabor amargo. Para os filmes com 0,75 mg de curcuminóides, 56% dos provadores (28) comprariam o produto, principalmente pelas propriedades funcionais, mas muitos enfatizaram que os filmes apresentaram um forte gosto residual. Os resultados mostram claramente que, com o aumento da concentração de extrato nos filmes, houve uma redução na intenção de compra do produto, o que certamente está associado à intensificação do sabor amargo e do gosto residual após a administração.

6. CONCLUSÃO

As macromoléculas amido pré-gelatinizado e hidroxpropilmetil celulose produziram um filme de desintegração oral com adequadas características estruturais e físicas, e com reduzido tempo de desintegração. A incorporação dos extratos de erva baleeira e cúrcuma nos filmes de desintegração oral promoveram, alterações dos aspectos visuais, das características microestruturais, dos espectros de infravermelho, das propriedades mecânicas, além de redução da mucoadesividade e aumento do tempo de desintegração dos filmes. No entanto, as alterações ocorridas não afetaram a integridade física dos filmes de desintegração oral, mostrando a possibilidade de incorporação dos extratos de erva baleeira e cúrcuma nos mesmos, visando veicular os compostos bioativos de interesse, flavonóides e curcuminóides.

Quanto às suas propriedades funcionais, os extratos de erva baleeira e cúrcuma apresentaram atividade antioxidante, atividade inibitória contra o fungo *Candida albicans*, mas não foram efetivos contra a bactéria *Streptococcus mutans*. O estudo da atividade anti-inflamatória mostrou que o extrato de erva baleeira apresentou maior capacidade de inibição da enzima COX-2 do que o extrato de cúrcuma.

Os filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma também apresentaram capacidade antioxidante em todas as metodologias avaliadas. Quanto à atividade antimicrobiana, apenas os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira foram efetivos contra a bactéria *Streptococcus mutans*. Quanto à atividade anti-inflamatória, os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira apresentaram elevada capacidade de inibição da enzima COX-2, mas os filmes incorporados com o extrato de cúrcuma apresentaram atividade reduzida.

A avaliação da estabilidade mostrou que o extrato de erva baleeira e os filmes incorporados com o extrato apresentaram excelente estabilidade dos flavonóides em função

do tempo de armazenamento. Para o extrato de cúrcuma, verificaram-se maiores variações na concentração de curcuminóides em função do tempo, mostrando a maior instabilidade deste extrato em temperaturas elevadas. Para os filmes incorporados com o extrato de cúrcuma, verificou-se que a matriz polimérica teve um papel muito importante na conservação dos curcuminóides, uma vez que a estabilidade do princípio ativo foi superior quando comparada ao extrato de cúrcuma puro. A estabilidade da atividade anti-inflamatória mostrou que o extrato de erva baleeira e os filmes com concentrações de 0,50 e 0,75 mg de flavonóides/FDO mantiveram a capacidade de inibição da enzima COX-2 nas condições estudadas. No entanto, o filme com concentração de 0,25 mg de flavonóides/FDO foi bastante susceptível ao tempo e às condições de armazenamento.

A avaliação sensorial dos filmes de desintegração oral mostrou a baixa aceitação dos filmes incorporados com o extrato de erva baleeira, o que se deve principalmente ao sabor amargo característico do extrato. Quanto aos filmes incorporados com o extrato de cúrcuma, a aceitação dos provadores foi um pouco superior, mas ainda relativamente baixa.

Este estudo mostrou a possibilidade de produção de filmes de desintegração oral à base das macromoléculas amido pré-gelatinizado e hidroxipropilmetil celulose e incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma. No entanto, os filmes incorporados com o extrato de erva baleeira apresentaram propriedades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória mais efetivas do que os filmes incorporados com o extrato de cúrcuma, o que, possivelmente, sugere que os flavonóides apresentaram propriedades funcionais superiores aos curcuminóides, uma vez que a concentração do princípio ativo foi sempre mantida constante nos filmes. De modo geral, os filmes de desintegração oral incorporados com extratos vegetais representam uma importante alternativa para a veiculação de compostos naturais com propriedades farmacológicas e para o desenvolvimento de fitoterápicos padronizados.

Os resultados deste trabalho apontam como perspectivas o estudo da aplicação *in vivo* dos filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira e cúrcuma, visando avaliar a capacidade de permeabilidade dos princípios ativos através da mucosa oral e a efetividade dos compostos bioativos em sistemas biológicos. Nas concentrações de flavonóides e curcuminóides desenvolvidas neste trabalho, os filmes de cúrcuma poderiam ser avaliados quanto sua capacidade antioxidante e os filmes de erva baleeira quanto suas propriedades antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUZZO, A. et al. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.87, p.581–588, 2012.

ABU-HUWAIJ, R. et al. Mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: mucoadhesive and physicochemical characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v.33, p.855–864, 2007.

ADARAMOYE, O. A. et al. Hypotensive and endothelium-independent vasorelaxant effects of methanolic extract from *Curcuma longa* L. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.124, p.457–462, 2009.

AGGARWAL, B. B. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. **Nature reviews Immunology**, London, v.3, p.745–56, 2003.

AGGARWAL, B.B. et al. Curcumin: the Indian solid gold. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.595, p.1–75, 2007.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.41, p.40–59, 2009.

AK, T.; GÜLÇİN, I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v.174, p.27–37, 2008.

AKHTAR, M-J. et al. Fabrication and physicochemical characterization of HPMC films with commercial plant extract: Influence of light and film composition. **Food Hydrocolloids**, v.31, p.420–427, 2013

AKISUE, M. K. et al. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura se *Cordia verbenacea* D.C.—Boraginacea. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, Araraquara, v.5, p.69–82, 1983.

AMMON, H. P. T.; WAHL, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa*. **Planta Medica**, Stuttgart, v.57, p.1–7, 1991.

ANAND, P. et al. Biological activities of curcumin and its analogues (Congeners) made by man and Mother Nature. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.76, p.1590–1611, 2008.

ANDREWS, G. P.; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v.71, p.505–518, 2009.

ANVISA. Fitoterápicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/poster_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2014.

ARBIT, E.; GOLDBERG, M. **Edible strips**. US 2013/ 052234-A1, 28 fev. 2013.

ASSAAD, E. et al. Polyelectrolyte complex of carboxymethyl starch and chitosan as drug carrier for oral administration. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.84, p.1399–1407, 2011.

ASTM D882-10. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: American Society for Testing and Materials.

AVACHAT, A. M. et al. Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.91, p.537– 542, 2013.

BALAJI, S.; CHEMPAKAM, B. Toxicity prediction of compounds from turmeric (*Curcuma longa* L). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, p.295102959, 2010.

BATISTUZZO, J.A et al. Formulário Médico-Farmacêutico. São Paulo-SP: Tecnopress, 3 ed. 2006.

BEECHER, G. R. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.133, p.3248S–3254S, 2003.

BENAVENTE-GARCÍA, O; CASTILLO, J.. Update on Uses and Properties of *Citrus* Flavonoids: New Findings in Anticancer, Cardiovascular, and Anti-inflammatory Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.56, p.6185–6205, 2008.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Analytical biochemistry**, New York, v.239, p.70–76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity . **LWT – Food Science and Technology**, London, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, New York, v.56, p.317-333, 1998.

BREITENBACH, A.; SCHWIER, N. **Rapidly disintegrating oral film formulation for olanzapin**. WO 2012/ 110222-A1, 23 ag. 2012.

BROUILLET, F.; BATAILLE, B.; CARTILIER, L. High-amylose sodium carboxymethyl starch matrices for oral, sustained drug-release: Formulation aspects and *in vitro* drug-release evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.356, p.52–60, 2008.

BRUSCHI, M. L. et al. Semisolid systes containing própolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 96, p. 2074-2089, 2007.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America - A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.100, p.131–134, 2005.

CARVALHO, P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.95, p.297–301, 2004.

CHAINANI-WU, N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.9 p.161–168, 2003.

CHATTOPADHYAY, I. et al. Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. **Current Science**, Bangalore, v.87, n.1, p.44-53, 2004.

CHEN, G.; LIU, B.; ZHANG, B. Characterization of composite hydrocolloid film based on sodium cellulose sulfate and cassava starch. **Journal of Food Engineering**, v.125, p.105-111, 2014.

CHISTÉ, R.C. et al. In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, London, v.127, p.419-426, 2011.

COATES, J. Interpretation of infrared spectra – a practical approach. In: Meyers, R.A. (Ed.), *Encyclopaedia of Analytical Chemistry*. John Wiley and Sons Ltd., Chichester., 2000.

COLORCON. Starch 1500[®] Partially Pregelatinized Maize Starch, 2013. Disponível em: <<http://www.colorcon.com/products-formulation/all-products/excipients/tablets/starch-1500>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

CONSTANTINI, D. **Fast dissolving drug delivery systems**. US 2011/ 237563-A1, 29 set. 2011.

CORNIELLO, C. Quick dissolving strips: from concept to commercialization. **Drug Delivery Technology**, v. 6, n.2, p.68–71, 2006.

DADHANIYA, P. et al. Safety assessment of a solid lipid curcumin particle preparation: Acute and subchronic toxicity studies. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.49, p.1834-1842, 2011.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. *Química de Alimentos*. 18 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAO, T. T. et al. Curcuminoids from *Curcuma longa* and their inhibitory activities on influenza A neuraminidases. **Food Chemistry**, London, v.134, p. 21-28, 2012.

DAUD, A. S.; SAPKAL, N. P.; BONDE, M. N. Development of *Zingiber officinale* in oral dissolving films: effect of polymers on *in vitro*, *in vivo* parameters and clinical efficacy. **Asian Journal of Pharmaceutics**, Madhya Pradesh, v. 5, n. 3, p. 183-189, 2011.

DHE PHARMA. SuperStarch® 200, 2012. Disponível em: <http://www.dfepharma.com/en/excipients/starch/partly-pregelatinised-maize-starch.aspx>. Acesso em: 30 jun. 2014.

DINGE, A.; NAGARSENKER, M. Formulation and evaluation of fast dissolving films for delivery of triclosan to the oral cavity. **AAPS PharmSciTech**, v.9, n. 2, 2008.

DIXIT, R. P.; PUTHLI, S. P. Oral strip technology: Overview and future potential. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.139, p.94–107, 2009.

EIGNER, D.; SCHOLZ D. Ferula asa-foetida and Curcuma longa in traditional medical treatment and diet in Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.67, p.1–6, 1999.

EDELMANN, A. et al. Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.1139–1145, 2001.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Anvisa**, v.1, 5 ed., Brasília, 2010.

FDA. Database of Select Committee on GRAS Substances (SCOGS) Reviews, 2006. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnDetailNavigation.cfm?rpt=scogslisting&id=38>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, Amsterdam, v.475, p.89–111, 2001.

FERNANDES, S. E. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (–)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v.569, p.228–236, 2007.

FERREIRA, A. O. Guia Prático da Farmácia Magistral. 2 ed., Juiz de Fora, 2002.

FLORIEN. Erva baleeira (*Cordia verbenacea*). Disponível em: <<http://florien.com.br/produto.php?id=135>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

FU, X. C. et al. Prediction of drug release from HPMC matrices: effect of physicochemical properties of drug and polymer concentration. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.95, p.209-216, 2004.

GARCÍA-LAFUENTE, A. et al. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, Basel, v.58, p.537–552, 2009.

GARSUCH, V.; BREITKREUTZ, J. Novel analytical methods for the characterization of oral wafers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v.73, p.195–201, 2009.

GARSUCH, V.; BREITKREUTZ, J. Comparative investigations on different polymers for the preparation of fast-dissolving oral films. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.62, p.539–545, 2010.

GILDA, S. et al. Activity of water-soluble turmeric extract using hydrophilic excipients. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.43, p.59–66, 2010.

GOVINDASAMY, P.; KESAVAN, B. R.; NARASIMHA, J. K. Formulation of unidirectional release buccal patches of carbamazepine and study of permeation through porcine buccal mucosa. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.3, n.12, p.995-1002, 2013.

HABIPOALLAH, G. et al. Histological evaluation of Curcuma longa–ghee formulation and hyaluronic acid on gingival healing in dog. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.120, p.335–341, 2008.

HAGESAETHER, E. et al. Mucoadhesion and drug permeability of free mixed films of pectin and chitosan: an in vitro and ex vivo study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v.71, p.325–331, 2009.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v.96, p.67-202, 2002.

HEARNDEN, V. et al. New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.16-28, 2012.

HOUGEE, S. et al. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to

selective elimination of monocytes/macrophages. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.69, p.241–248, 2005.

HU, P.; HUANG, P.; CHEN, M. W. Curcumin reduces *Streptococcus mutans* biofilm formation by inhibiting sortase A activity. **Archives of Oral Biology**, 2013.

IMRAM, M. et al. Cellulose derivative based active coatings: Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.81, p.219–225, 2010.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Chemistry and biological activities of *C. longa*. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v.16, p.533–548, 2005.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. **Food Chemistry**, London, v.98, p.720–724, 2006.

JEON, J. G. et al. Natural Products in Caries Research: Current (Limited) Knowledge, Challenges and Future Perspective. **Caries Research**, Basel, v.45, p.243–263, 2011.

JIMENEZ, A. et al. Influence of hydroxypropylmethylcellulose addition and homogenization conditions on properties and ageing of corn starch based films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.89, p.676 – 686, 2012.

JONES, E. et al. Monolayered multipolymeric buccal films with drug and polymers of opposing solubilities for ARV therapy: Physico-mechanical evaluation and molecular mechanics modelling. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.455, p.197–212, 2013.

JORGE, L.I.F. et al. Identificação de *Cordia verbenaceae* D.C. (erva baleeira) como fitoterápico. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v.79, p.69–71, 1998.

JUG, M. et al. Development of low methoxy amidated pectin-based mucoadhesive patches for buccal delivery of triclosan: Effect of cyclodextrin complexation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.90, p.1794–1803, 2012.

KARAMAN, M. et al. Anti-inflammatory effects of curcumin in a murine model of chronic asthma. **Allergologia et Immunopathologia**, Madri, v.40, n.4, p.210–214, 2012.

KIM, D. S. H. L. et al. Curcuminoids from *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae) that protect

PC12 rat pheochromocytoma and normal human umbilical vein endothelial cells from β A(1-42) insult. **Neuroscience Letters**, Limerick, v.303, p.57-61, 2001.

KLOESCH, B. et al. Anti-inflammatory and apoptotic effects of the polyphenol curcumin on human fibroblast-like synoviocytes. **International Immunopharmacology**, Amsterdam, v.15, p.400-405, 2013.

KOO, H. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, v. 45, p.141-148, 2000.

KULKARNI, N.; KUMAR, L. D.; SORG, A. **Fast dissolving orally consumable films containing an antitussive and a mucosa coating agent**. US 206942, 6 nov. 2003.

KUMAR, S. R. et al. Simultaneous spectrophotometric estimation of curcuminoids and gallic acid in bulk drug and ayurvedic polyherbal tablet dosage form. **International Journal of Pharmaceutical Quality Assurance**, v.2, n.1, p.56-59, 2010.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **European Journal of Nutrition**, v.38, p.133–142, 1999

LANTZ, R. C. et al. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, p.445–452, 2005.

LI, N. et al. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) – induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. **Carcinogenesis**, Oxford, v.23, n.8, p.1307-1313, 2002.

LUO, Y. et al. Isolation, characterisation, and antioxidant activities of flavonoids from chufa (*Eleocharis tuberosa*) peels. **Food Chemistry**, London, v.164, p.30-35, 2014.

MAGALHÃES, L. M. et al. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v.613, p.1-19, 2008

MARTINS, J. T. et al. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.27, p.220-227, 2012.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, London, v.151, p.618–627, 2007.

MEHER, J. G. et al. Development and characterization of cellulose–polymethacrylate mucoadhesive film for buccal delivery of carvedilol. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.96, p.172– 180, 2013.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v.56, p.89–96, 2011.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, Essex, v.100, p.6615–6623, 2009.

MIRO, A. et al. Engineering poly(ethylene oxide) buccal films with cyclodextrin: A novel role for an old excipient? **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.452, p.283–291, 2013.

MISHRA, R.; AMIN, A. Quick API delivery. **Pharmaceutical Technology Europe**, v.19, p.35–39, 2007.

MISHRA, R.; AMIN, A. Formulation development of taste-masked rapidly dissolving films of cetirizine hydrochloride. **Pharmaceutical Technology**, 2009.

MOHAMED, M. I. et al. Buccal Mucoadhesive Films Containing Antihypertensive Drug: In vitro/in vivo Evaluation. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Jaipur, v.3, n.6, p.665–686, 2011.

MOHANTY, I. et al. Protective effects of *Curcuma longa* on ischemia-reperfusion induced myocardial injuries and their mechanisms. **Life Sciences**, Elmsford, v.75, p.1701 – 1711, 2004.

MORALES, J. O.; MCCONVILLE, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v.77, p.187–199, 2011.

MOURA, M. R. et al. Development of cellulose-based bactericidal nanocomposites containing silver nanoparticles and their use as active food packaging. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.109, p.520-524, 2012.

MURA, P. et al. Development of Mucoadhesive Films for Buccal Administration of Flufenamic Acid: Effect of Cyclodextrin Complexation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v.99, n.7, 2010.

MYERS, G. L.; MADHU, H. et al. **Orally administrable film dosage forms containing ondansetron**. US 2011/ 160264-A1, 28 jul. 2011.

NISHIMURA, M. et al. In vitro and in vivo characteristics of prochlorperazine oral disintegrating film. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.368, p.98–102, 2009.

NISHIYAMA, T. et al. Curcuminoids and Sesquiterpenoids in Turmeric (*Curcuma longa* L.) Suppress an Increase in Blood Glucose Level in Type 2 Diabetic KK-A^y Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, p.959–963, 2005.

NOVAK, S. D. et al. Characterization of physicochemical properties of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) type 2208 and their influence on prolonged drug release from matrix tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v.66, p.136–143, 2012.

OFICINA DE ERVAS. Cúrcuma. Disponível em:
<http://www.oficinadeervas.com.br/detalhe.php?id_produto=19&p=curcuma>. Acesso em: 01 jul. 2014.

OKABE, H. et al. Development of an easily swallowed film formulation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.355, p.62–66, 2008.

OLIVEIRA, D. M. C. et al. *Cordia verbenacea* and secretion of mast cells in different animal species. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.135, n.2 p.463-468, 2011.

ORTEGA-TORO et al. Effect of the incorporation of surfactants on the physical properties of corn starch films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.38, p.66-75, 2014.

PALLA-PAPAVLU, A. et al. Characterization of ethylcellulose and hydroxypropyl methylcellulose films deposited by matrix-assisted pulsed laser evaporation. **Applied Surface Science**, Amsterdam, v.302, p.87-91, 2013.

PANDIT, S. et al. Separation of an effective fraction from turmeric against *Streptococcus mutans* biofilms by the comparison of curcuminoid content and anti-acidogenic activity. **Food Chemistry**, London, v.126, p.1565-1570, 2011.

PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato. 25 ed., 279 p. São Paulo: IBRASA, 1997.

PARISOTTO, E. B. et al. The antitumor activity of extracts from *Cordia verbenacea* D.C. obtained by supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v.61, p.101-107, 2012.

PARK, Y.K. et al. Estudo de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v.38, p.1253-1259, 1995.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.110, p.323–333, 2007.

PEH, K. K.; WONG, C. F. Polymeric Films as Vehicle for Buccal Delivery: Swelling, Mechanical, and Bioadhesive Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.2, n.2, p.53-61, 1999.

PENDEKAL, M. S.; TEGGINAMAT, P. K. Formulation and evaluation of a bioadhesive patch for buccal delivery of tizanidine. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v.2, n.3, p.318–324, 2012.

PERUMAL, V. A. et al. Investigating a new investigating a new approach to film casting for enhanced drug content uniformity in polymeric films. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.34, p.1036–1047, 2008.

PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. **Farmaco**, v.54, p.1, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidante capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

PULLA REDDY, A.; LOKESH, B. R. Effect of dietary turmeric (*Curcuma longa*) on iron-induced lipid peroxidation in the rat liver. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.32, p.279-283, 1994.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.72, p.1439-1452, 2006.

RAMSEWAK, R.S. et al. Cytotoxicity, antioxidante and anti-inflammatory activities of Curcumins I-III from *Curcuma longa*. **Phytomedicine**, Jena, v.7, n.4, p.303-308, 2000.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Elmsford, v.39, p.603–613, 2001.

RATHEE, P. et al. Mechanism of Action of Flavonoids as Anti-inflammatory Agents: A Review. **Inflammation & Allergy-Drug Targets**, v.8, n.3, p.229-235, 2009.

RIKER, D. K. et al. **Rapidly dissolving edible strips for treating obesity**. US 2004/180077-A1, 16 set. 2004.

ROTELLI, A. E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, London, v.48, p.601–606, 2003.

RUBY, A. J. et al. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.94, p.79-83, 1995.

SADOWSKA-BARTOSZ, I. et al. Protection against peroxynitrite reactions by flavonoids. **Food Chemistry**, London, v.164, p.228-233, 2014.

SADZUKA, Y. et al. Beneficial effects of curcumin on antitumor activity and adverse reactions of doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.432, p.42-49, 2012.

SAHNI J. et al. Design and *in vitro* characterization of buccoadhesive drug delivery system of insulin. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, p.61-65, 2008.

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, L. et al. Characterization of edible films based on hydroxypropylmethylcellulose and tea tree essential oil. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.23, p.2102–2109, 2009.

SASSONE, J. Amido de milho pregelatinizado como excipiente magistral, 2012. Disponível em: <<http://www.proquimo.com.br/news/amidoMilho>>. Acesso em: 30 jun. 2014.

SEMALTY, M.; SEMALTY, A.; KUMAR, G. Formulation and characterization of mucoadhesive buccal films of glipizide. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.70, p.43-48, 2008.

SENGUPTA, M.; SHARMA, G. D.; CHAKRABORTY, B. Hepatoprotective and immunomodulatory properties of aqueous extract of *Curcuma longa* in carbon tetra chloride intoxicated Swiss albino mice. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p.193-199, 2011.

SERTIÉ, J. A. A. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Planta Medica**, Stuttgart, v.54, p.7–10, 1988.

SERTIÉ, J. A. A. et al. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, Stuttgart, v.56, p.36–40, 1990.

SERTIÉ, J. A. A. et al. Pharmacological assay of *cordia verbenacea* iii: oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.31, p.239-247, 1991.

SERTIÉ, J. A. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, Jena, v.12, p.338–344, 2005.

SHANKAR, T. N. et al. Toxicity studies on turmeric (*Curcuma longa*): acute toxicity studies in rats, guineapigs & monkeys. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v.18:73-75, 1980.

SHARMA, R. A. et al. Curcumin: The story so far. **European Journal of Cancer**, New York, v.41, p.1955–1968, 2005.

SHARMA, A. et al. Inhibition of Hsp27 and Hsp40 potentiates 5-fluorouracil and carboplatin mediated cell killing in hepatoma cells. **Cancer Biology and Therapy**, v.8, p.2106–2113, 2009.

SHILEDAR, R. R. et al. Formulation and in vitro evaluation of xanthan gum-based bilayered mucoadhesive buccal patches of zolmitriptan. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v.101, p.1234–1242, 2014.

SHIMODA, H. et al. Preparation of a fast dissolving oral thin film containing dexamethasone: A possible application to antiemesis during cancer chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v.73, p.361–365, 2009.

SHISHODIA, S. Molecular Mechanisms of Curcumin Action: Gene Expression. **Biofactors**, v.39, n.1, p.37-55, 2013.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.64, p.163-174, 2012.

SILVA, S. D. et al. Application of FTIR-ATR to Moscatel dessert wines for prediction of total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v.150, p.489-493, 2014.

SINGH, G. et al. Curcuma longa— chemical, antifungal and antimicrobial investigations of rhizome oil. **Indian Perfumer**, v.47, n.2, p.173–178, 2003.

SINGH, G. et al. Comparative study of chemical composition and antioxidant activity of fresh and dry rhizomes of turmeric (*Curcuma longa* Linn.). **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.48, p.1026–1031, 2010.

SIQUEIRA, S. **Atividades biológicas de extratos de *Solanum paludosum* Moric. Obtidos por maceração e extração supercrítica.** 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

SOMPARN, P. et al. Comparative Antioxidant Activities of Curcumin and Its Demethoxy and Hydrogenated Derivatives. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v.30, n.1, p.74-78, 2007.

SONI, K. B.; KUTTAN, R. Effect of oral curcumin administration on serum peroxides and cholesterol levels in human volunteers. **Indian Journal of Physiology and Pharmacology**, New Delhi, v.36, n.4, p.273–275, 1992.

STOCKER, R.; O'HALLORAN, R.A. Dealcoholized red wine decreases atherosclerosis in apolipoprotein E gene-deficient mice independently of inhibition of lipid peroxidation in the artery wall. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.79, p.123–130, 2004.

STONE, H.; SIDEL, J. L. Sensory evaluation practices. Oxford: Academic. 3 ed, 400 p., 2004.

STRIMPAKOS, A. S.; SHARMA, R. A. Curcumin: Preventive and Therapeutic Properties in Laboratory Studies and Clinical Trials. **Antioxidants & Redox Signalling**, v.10, n.3, p.511-545, 2008.

SUGIMOTO, L. Caixaras inspiram creme contra dor muscular. Jornal da Unicamp, Campinas, maio 2005. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/maio2005/ju288pag03.html>. Acesso em: 14 fev. 2012.

TARANTILIS, P. A. et al. Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.111, p.192–196, 2008.

THOMAS, D. J.; ATWELL, W. A. **Starches. Practical guides for the food industry**. Minnesota – USA, American Association of Cereal Chemists, 1999.

THOMAS-EAPEN, N. E. Turmeric: the intriguing yellow spice with medicinal properties. **Explore**, v.5, n.2, p.114-115, 2009.

TIAN, S-S. et al. Flavonoids from the leaves of *Carya cathayensis* Sarg. inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. **Fitoterapia**, v.92, p.34-40, 2014.

TIWARI, S. et al. Fully formulated film coating systems and recent advances. **Pharma Times**, v.45, n.3, 2013.

TUOVINEN, L.; PELTONEN, S.; JÄRVINEN, K. Drug release from starch-acetate films. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v.91, p.345–354, 2003.

ULBRICHT, C. et al. Turmeric (*Curcuma longa*). **Alternative and Complementary Therapies**, v.17, n.4, p.225-236, 2011.

VASANTHA, P. V. et al. Development and characterization of Eudragit based mucoadhesive buccal patches of salbutamol sulfate. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.19, p.207-214, 2011.

VERMA, N.; CHATTOPADHYAY, P. Preparation of mucoadhesive patches for buccal administration of metoprolol succinate: *in vitro* and *in vivo* drug release and bioadhesion. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.1, n.1, p.9-17, 2012.

VICENTINI, N. M. et al. Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. **Spectroscopy Letters**, New York, v. 38, n. 6, p. 749-767, 2005.

VILLACRÉS, R. A. E.; FLORES, S. F.; GERSCHENSON, L. N. Biopolymeric antimicrobial films: Study of the influence of hydroxypropyl methylcellulose, tapioca starch and glycerol contents on physical properties. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v.36, p.108–117, 2014.

VIRIDEN, A.; WITTGREN, B.; LARSSON, A. Investigation of critical polymer properties for polymer release and swelling of HPMC matrix tablets. **European Journal of Pharmaceutical Science**, v.36, p.297–309, 2009.

VITOR, R. F. et al. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.93, p.363–370, 2004.

WANG, L. et al. Distinctive Antioxidant and Antiinflammatory Effects of Flavonols. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.54, 9798-9804, 2006.

WATANABE, S. et al. Effect of oral mucosal adhesive films containing ginsenoside Rb1 on 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 616, p. 281-286, 2009.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, London, v.37, 99-105, 1998.

WU, P. et al. Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa*(Ait.) Hassk. **Food Chemistry**, London, v.173, p.194-202, 2015.

XIA, X. et al. Ethanolic extracts from *Curcuma longa* attenuates behavioral, immune, and neuroendocrine alterations in a rat chronic mild stress model. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n.5, p.938-944, 2006.

XU, Y. C. et al. Structure–activity relationships of flavonoids for vascular relaxation in porcine coronary artery. **Phytochemistry**, New York, v.68, p.1179–1188, 2007.

ZHANG, Y.; HAN, J.H. Plasticization of pea starch films with monosaccharides and polyols. **Journal of Food Science**, Chicago, v.71, n.6, E253–E261, 2006.

ZHANG, S. et al. Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.70, p.627–639, 2005.