UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOSIANE GONÇALVES BORGES

**Desenvolvimento de filmes de desintegração oral para liberação de
compostos bioativos**

PIRASSUNUNGA

2013

JOSIANE GONÇALVES BORGES

**Desenvolvimento de filmes de desintegração oral para liberação de
compostos bioativos**

Versão corrigida

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

Área de Concentração: Ciência da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho.

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

B732d Borges, Josiane Gonçalves
Desenvolvimento de filmes de desintegração oral para
liberação de compostos bioativos / Josiane Gonçalves
Borges. -- Pirassununga, 2013.
105 f.
Dissertação (Mestrado) -- 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. Extrato etanólico de própolis 2. Gelatina
3. Colágeno hidrolisado 4. Liberação *in vitro*
5. Estabilidade. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a primeiramente a Deus pela força e oportunidade a mim oferecida, e por iluminar o meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Elizete e Paulo, pela dedicação, ensinamentos e apoio durante toda a minha caminhada e vida acadêmica. Mesmo distantes fizeram toda a diferença para mim.

Agradeço a minha orientadora, Professora Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho, por ter me acolhido acreditando no meu trabalho e por todos os momentos de incentivos, ensinamentos, paciência e suporte. Sem você este trabalho não seria possível.

Aos meus irmãos, Cristiane e Romão, que sempre estiveram ao meu lado. Agradeço pelo apoio e companheirismo.

Ao meu namorado, Diego, pela carona, carinho, paciência e compreensão em todos os momentos que não pude estar presente ao seu lado para realização deste trabalho. Agradeço também aos seus pais, Sueli e Júlio, e sua irmã, Juliana, que me acolheram como membro da família.

À Camila Bitencourt, pela amizade sincera, por todo apoio e incentivo. Você é uma pessoa maravilhosa e me sinto honrada de poder estar ao seu lado, como amiga e como colega de trabalho.

À Renata e Vitor, pelo apoio, ensinamentos e amizade. Obrigada pelos ensinamentos, conversas e risadas.

Agradeço às minhas companheiras de república, pelos momentos de descontração e incentivo durante toda esta caminhada, em especial a Lara, Luísa e Suellen por terem sido como irmãs para mim durante este tempo.

Aos estagiários do Laboratório, em especial para Aline e Marina, obrigada por todo o auxílio para concretização deste trabalho.

Agradeço a minha família, primos e tios, por todo apoio e força em todos os momentos, em especial para o meu padrinho com as mensagens de incentivo pela manhã.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Alimentos pela colaboração e auxílio.

Aos membros da seção de pós-graduação que foram sempre muito prestativos.

Aos funcionários da biblioteca por toda a atenção.

Aos todos os meus amigos da Pós-graduação, pelo apoio, ajuda e amizade.

Aos funcionários do ZEA que sempre foram tão prestativos e companheiros quando precisei, em especial para o Keila, Guilherme, Marcelo e Tatiana.

Aos professores Walter Velloso, Clóvis Fischer, Rafael Souza, Eliria Pallone e Sergio David por todo o apoio e por permitirem a continuação do meu projeto.

À Ana Monica pelas análises de DSC, ensinamentos e apoio em outras análises.

Ao laboratório de analítica e calibração da UNICAMP pelas análises de microestrutura.

Enfim, obrigada a todos que fizeram a realização deste trabalho ser possível!

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará
fazendo o impossível.”*
(São Francisco de Assis)

RESUMO

BORGES, J. G. **Desenvolvimento de filmes de desintegração oral para liberação de compostos bioativos**. 2013. 105f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga 2013.

É crescente o interesse dos consumidores por produtos naturais com apelo funcional. Por isso tem se estudado novos veículos de liberação de compostos bioativos, como por exemplo, os filmes de desintegração oral. A própolis é uma fonte natural rica em compostos ativos, como por exemplo, os compostos fenólicos, que lhe confere atividade antimicrobiana e antioxidante. O colágeno hidrolisado pode apresentar diversos benefícios quando ingerido, como aumento da densidade óssea e representa uma boa fonte de peptídeos. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar os filmes de desintegração oral à base de gelatina aditivados com colágeno hidrolisado (CH) e extrato etanólico de própolis (EEP). Os filmes foram produzidos pela técnica de casting mantendo constante a massa de gelatina (m_G) colágeno hidrolisado (m_{CH}) em 2 g de m_{G+CH} (g/100g de solução filmogênica), e a concentração de sorbitol em 30g (g/100g de m_{G+CH}). Foram avaliadas diferentes concentrações de CH (0, 10, 20 e 30 g/100 g de m_{G+CH}) e de EEP (0, 100 e 200 g /100 g de m_{G+CH}). Os filmes foram caracterizados em relação à cor e opacidade, matéria total solúvel, umidade, propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação), microscopia eletrônica de varredura, mucoadesividade, ângulo de contato, tempo de desintegração, grau de intumescimento, concentração de compostos fenólicos, liberação *in vitro*, cinética de liberação, calorimetria diferencial de varredura, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), atividade antimicrobiana e estabilidade dos compostos fenólicos em função do tempo armazenamento. O aumento da concentração de CH provocou aumento significativo da solubilidade. Nas propriedades mecânicas foi observado aumento da alongação para os filmes com adição de colágeno em relação ao filme controle e redução significativa da tensão na ruptura com o aumento da concentração de CH. Não foi observado variação da microestrutura com a adição de colágeno e os filmes com maior concentração de CH foram mais mucoadesivos. O aumento da concentração de CH provocou redução do tempo de desintegração, apresentando uma liberação mais rápida dos compostos fenólicos. Em relação ao aumento da concentração de EEP foram observadas alterações nos parâmetros de cor e opacidade devido a cor característica do extrato. Observou-se redução da solubilidade e aumento na tensão de ruptura com o aumento de EEP. Para filmes aditivados com EEP foi observada uma microestrutura menos compacta e desordenada e aumento da mucoadesividade. O aumento da concentração de EEP provocou aumento do tempo de desintegração, com redução do grau de intumescimento, e uma liberação mais lenta dos compostos fenólicos. O processo de produção dos filmes não provocou degradação dos compostos fenólicos e os filmes aditivados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Os filmes de desintegração oral mantiveram a concentração de compostos fenólicos após 84 dias de armazenamento. Desta forma, os filmes de desintegração oral aditivados com extrato etanólico de própolis e colágeno hidrolisado representam uma boa alternativa como veículo de compostos fenólicos na cavidade oral.

Palavras-chave: Extrato etanólico de própolis, gelatina, colágeno hidrolisado, liberação *in vitro*, estabilidade.

ABSTRACT

BORGES, J. G. **Development of orally disintegrating films for release of bioactive compounds.** 2013. 105p. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga 2013.

There is an increase in the interest of consumers for natural products with functional appeal. Therefore, it has been studied new vehicles for release of bioactive compounds, such as orally disintegrating films. Propolis is a rich natural source of active compounds, such as phenolic compounds, responsible for antimicrobial and antioxidant activity. Hydrolyzed collagen may have several benefits when ingested, such as increased bone density and it is a good source of peptides. This study aimed the development and characterization of orally disintegrating films gelatin-based additives with hydrolyzed collagen (CH) and ethanol extract of propolis (EEP). The films were produced by casting, keeping mass constant of gelatin (m_G) and hydrolyzed collagen (m_{CH}) at 2 g of m_{G+CH} /100 g filmogenic solution, and the concentration of sorbitol at 30 g/100 g m_{G+CH} . It was evaluating different concentrations of CH (0, 10, 20 and 30 g/100 g of m_{G+CH}) and EEP (0, 100 and 200 g/100 g of m_{G+CH}). The films were characterized regarding color and opacity, total soluble matter, moisture, mechanical properties (tensile strength and elongation), scanning electron microscopy, mucoadhesion, contact angle, disintegration time, swelling degree, concentration of phenolic compounds, *in vitro* release, release kinetics, differential scanning calorimetry, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), antimicrobial activity and stability of phenolic compounds were evaluated during the storage time. Increasing in concentration of CH caused a significant increase of solubility. For mechanical properties was observed increased at elongation for films with collagen in relation to control film and significant reduction of tensile strength with increasing of CH. It was not observed difference in microstructure because of CH addition and the films with higher concentrations of CH showed higher mucoadhesive. The increased of CH concentration promoted a reduction in disintegration time, showed a faster release of phenolic compounds. The increased of EEP concentration influenced color parameters and opacity due to color of the extract. It was observed a reduction of the solubility and an increase in tensile strength with the increase of EEP. The addition of EEP promoted a microstructure less compact and more disordered structure and increased mucoadhesion. Increased in EEP concentration increased disintegration time, reduced swelling degree, and caused a slower release of phenolic compounds. The production process did not cause degradation of phenolic compounds and additives films exhibited antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*. The orally disintegrating films remained the concentration of phenolic compounds after 84 days of storage. Thus, the orally disintegrating film additives with ethanol extract of propolis and hydrolyzed collagen represent a good alternative as a vehicle of phenolic compounds in the oral cavity.

Keywords: Ethanol extract of propolis, gelatin, hydrolyzed collagen, *in vitro* release, stability.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema da estrutura do tecido da mucosa oral, com ilustração das diferentes vias de absorção de drogas por esta mucosa.	29
Figura 2 - Estruturas básicas do flavonoide.	34
Figura 3 - Algumas estruturas básicas de flavonoides importantes..	34
Figura 4 - Processo de produção do extrato etanólico de própolis.....	40
Figura 5 - Fluxograma de produção de filmes de desintegração oral à base de gelatina e colágeno hidrolisado contendo extrato etanólico de própolis (EEP) pela técnica de “casting”.	43
Figura 6 - Representação da análise de mucoadesividade dos filmes de desintegração oral. .	48
Figura 7 - Ângulo de contato (ϕ) pelo método da gota.	49
Figura 8 - Extrato etanólico de própolis (proporção = 30g de resina/100 mL de álcool etílico 80%, tempo = 30 min e temperatura = 50°C).	55
Figura 9 - Sólido de cor do sistema CIE Lab. (Fonte: adaptada de Moléculas: soluções para plastisóis.	56
Figura 10 - Filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}), sendo: (a) C_{CH} = 0 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 0 g/100 g de m_{G+CH} ; (b) C_{CH} = 10 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 0g/100g de m_{G+CH} ; (c) C_{CH} = 20 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 0 g/100 g de m_{G+CH} ; (d) C_{CH} = 30 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 0 g/100 g de m_{G+CH} ; (e) C_{CH} = 0 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 100g/100g de m_{G+CH} ; (f) C_{CH} = 10 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 100 g/100 g de m_{G+CH} ; (g) C_{CH} = 20 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 100 g/100 g de m_{G+CH} ; (h) C_{CH} = 30 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 100 g/100 g de m_{G+CH} ; (i) C_{CH} = 0 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 200 g/100 g de m_{G+CH} ; (j) C_{CH} = 10 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 200 g/100 g de m_{G+CH} ; (k) C_{CH} = 20 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 200 g/100 g de m_{G+CH} ; (l) C_{CH} = 30 g/100 g de m_{G+CH} e C_{EEP} = 200 g/100 g de m_{G+CH}	57
Figura 11 - Exemplos de curvas de tensão versus elongação dos filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}): (a) C_{EEP} = 0g de extrato/100 g de m_{G+CH} , (b) C_{EEP} = 100g de extrato/100 g de m_{G+CH} ; e (c) C_{EEP} = 200g de extrato/100 g de m_{G+CH}	62

Figura 12 - Efeito da incorporação de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na microestrutura de fratura dos filmes de desintegração oral à base de gelatina: (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (e) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (f) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (g) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (h) $C_{CH} = 30$ g/100g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (i) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (j) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (k) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (l) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} 66

Figura 13 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) no grau de intumescimento (GI) em relação ao tempo dos filmes com diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}), sendo: (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; e (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} 73

Figura 14 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) na liberação *in vitro* de filmes de desintegração com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}), sendo: (a) $C_{EEP} = 100$ g de extrato etanólico de própolis/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{EEP} = 200$ g de extrato etanólico de própolis/100 g de m_{G+CH} 76

Figura 15 – Exemplos de termogramas obtidos na análise calorimétrica dos filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e 30 g de colágeno hidrolisado/100 g de m_{G+CH} 80

Figura 16 - Espectros de absorção de infravermelho para filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}): (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} 83

Figura 17 - Atividade antimicrobiana dos filmes de desintegração oral com: (A) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (B) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (C) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (D) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} ; (E) $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (F) $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 10$ g/ 100g de m_{G+CH} ; (G) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (H) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 30$

g/100 g de m_{G+CH} ; (I) $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 0$ g/100g de m_{G+CH} ; (J) $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (K) $C_{EEP} = 0$ g/100g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (L) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH}84

Figura 18 - Efeito do tempo de armazenamento (semanas) na concentração de compostos fenólicos dos filmes de desintegração oral à base de gelatina com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}): (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH}87

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de aplicações de diferentes tipos de filmes orais e princípio ativo incorporado.....	20
Tabela 2 - Macromoléculas e componentes ativos utilizados para produção de filmes desintegração oral.....	24
Tabela 3 - Produtos naturais e suas propriedades medicinais.	32
Tabela 4 - Formulações de filmes de desintegração oral em relação à concentração de gelatina (GE), colágeno hidrolisado (CH) e extrato etanólico de própolis (EEP).....	44
Tabela 5 - Concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{fenólicos}}$), rendimento de sólidos totais (RST), luminosidade (L^*), croma a^* (a^*) e croma b^* (b^*) do extrato etanólico de própolis. .	54
Tabela 6 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos parâmetros de cor ($*L$, $*a$ e $*b$) e opacidade dos filmes.	58
Tabela 7 - Efeito da incorporação do colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na matéria total solúvel dos filmes de desintegração oral.	60
Tabela 8 - Efeito da incorporação de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na umidade, tensão na ruptura (TS) e elongação (E) dos filmes.	64
Tabela 9 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na mucoadesividade dos filmes de desintegração oral à base de gelatina.	68
Tabela 10 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) no valor do ângulo de contato entre a gota de água e o filme de desintegração oral.	69
Tabela 11 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) no tempo de dissolução dos filmes de desintegração oral.....	71
Tabela 12 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) na concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{Fenólicos}}$) nos filmes de desintegração oral.	74
Tabela 13 - Efeito da incorporação do colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos parâmetros de cinética de liberação dos filmes de desintegração oral.	78

Tabela 14 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos parâmetros calorimétricos: temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH).80

Tabela 15 - Efeito da concentração do colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos filmes de desintegração oral na atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.85

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1. Filmes de desintegração oral.....	18
2.1.1. Aplicações de filmes de desintegração oral.....	19
2.2. Produção dos filmes orais	21
2.2.1. Gelatina e sua aplicação na produção de filmes	25
2.3. Colágeno hidrolisado	26
2.4. Mecanismos de absorção de componentes ativos	27
2.5. Veículos de liberação oral.....	29
2.6. Produtos naturais para uso medicinal	31
2.6.1. Compostos fenólicos	33
2.6.2. Própolis.....	35
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Material.....	39
3.2. Produção da solução tampão fosfato salino (pH = 6,8)	39
3.3. Produção do Extrato etanólico de própolis	39
3.3.1. Rendimento de sólidos totais	40
3.3.2. Concentração de compostos fenólicos.....	40
3.3.3. Parâmetros de cor	41
3.4. Produção dos filmes de desintegração oral	41
3.5. Caracterização dos filmes de desintegração oral	45
3.5.1. Cor e opacidade	45
3.5.2. Matéria total solúvel	45
3.5.3. Umidade	46
3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura	46
3.5.5. Propriedades mecânicas.....	47

3.5.6.	Mucoadesividade <i>in vitro</i>	47
3.5.7.	Ângulo de contato.....	48
3.5.8.	Tempo de desintegração	49
3.5.9.	Grau de intumescimento	49
3.5.10.	Concentração dos compostos fenólicos	50
3.5.11.	Liberação <i>in vitro</i>	50
3.5.12.	Cinética de liberação.....	51
3.5.13.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	51
3.5.14.	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	52
3.5.15.	Microbiologia.....	52
3.6.	Análise de estabilidade	53
3.7.	Análise estatística	53
4.	RESULTADOS	54
4.1.	Caracterização do extrato etanólico de própolis	54
4.2.	Caracterização dos filmes de desintegração oral	56
4.2.1.	Cor e opacidade	56
4.2.2.	Matéria total solúvel	59
4.2.3.	Umidade e propriedades mecânicas	61
4.2.4.	Microscopia eletrônica de varredura	65
4.2.5.	Mucoadesividade <i>in vitro</i>	67
4.2.6.	Ângulo de contato.....	69
4.2.7.	Tempo de desintegração	71
4.2.8.	Grau de intumescimento	72
4.2.9.	Concentração de compostos fenólicos totais dos filmes	74
4.2.10.	Liberação <i>in vitro</i>	75
4.2.11.	Cinética de liberação.....	77
4.2.12.	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	79

4.2.13.	Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	81
4.2.14.	Atividade antimicrobiana.....	84
4.2.15.	Análise de estabilidade dos filmes.....	86
5.	CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....		89

1. INTRODUÇÃO

Atualmente é crescente a busca pelos consumidores por produtos mais saudáveis e com baixo impacto ambiental. Desta forma, os consumidores induzem as indústrias, cada vez mais, a desenvolverem produtos mais sustentáveis e com apelo funcional. Dentre os produtos com apelo funcional pode-se citar a incorporação de probióticos em salsichas (VUYST; FALONY; LOROY, 2008), extratos de vegetais em produtos de panificação (PENG et al., 2010), óleos essenciais em biscoitos (SULTAN et al., 2012) e fibras dietéticas em produtos de panificação, geleias e sopas (ELLEUCH et al., 2011). Porém a maior parte destes componentes incorporados aos alimentos apresenta sua função e/ou absorção nas últimas fases do trato gastrointestinal, desta forma os componentes estão sujeitos à degradação do trato gastrointestinal e ao efeito hepático de primeira passagem (SHOJAEEI, 1998). A incorporação de componentes ativos para absorção na mucosa bucal possui a vantagem do aumento da biodisponibilidade, pois os compostos não sofrem a degradação das enzimas e variações de pH de todo o trato gastrointestinal (FIGUEIRAS; CARVALHO; VEIGA, 2006).

Os filmes de desintegração oral são películas finas produzidas de forma a se dissolver e liberar todo o componente ativo na cavidade bucal, e possuem a vantagem de apresentar elevada área de contato que garante uma maior superfície para liberação em relação a outros métodos de liberação (DIXIT; PUTHLI, 2009). Além disso, os filmes são de fácil transporte e manuseio, e podem ser produzidos a partir de uma grande diversidade de macromoléculas, dependendo das propriedades físico-químicas do componente ativo de interesse (DIXIT; PUTHLI, 2009; HASHIDE et al., 2012; NISHIGAKI et al., 2012). Esses filmes tem sido produzidos por macromoléculas naturais e/ou sintéticas como polivinilpirrolidona (GAISFORD et al., 2009), matodextrina (CILURZO et al., 2008), celulose microcristalina (NISHIGAKI et al.,

2012), blendas de quitosana e gelatina (ABRUZZO et al., 2012), dentre outras. Desta forma os filmes de desintegração oral podem ser uma boa alternativa para incorporação de componentes ativos para liberação na mucosa bucal.

A gelatina pode ser utilizada no desenvolvimento de filmes de desintegração oral devido à sua capacidade de formação de matrizes poliméricas (MANDAL; MANN; KUNDY, 2009; SHUTAVA; BALKUNDI; LVOV, 2009). O colágeno hidrolisado sozinho forma uma matriz muito frágil para ser manuseado (ZHANG; LI; SHI, 2006), porém pode apresentar outras funcionalidades, como por exemplo, auxiliar na manutenção óssea devido ao aumento da atividade dos osteoblastos (GUILLERMINET et al., 2010). Além disso, o colágeno hidrolisado, por passar por uma hidrólise enzimática, e não apenas ácida ou básica como a gelatina (HOQUE et al., 2011), apresenta peptídeos menores (OESESSER et al., 1999), e consequentemente, apresenta maior solubilidade, influenciando, possivelmente, nas características do filme, bem como o processo de liberação do componente ativo.

Os compostos bioativos naturais tem ganho grande destaque em pesquisas devido a crescente preocupação dos consumidores pela substituição dos produtos sintéticos por naturais. Por isso, produtos que há muitos anos eram utilizados pela medicina popular, como por exemplo, óleos e extratos de produtos naturais, tem sido pesquisados para comprovar sua eficiência para tratamento de diversas doenças, como processos inflamatórios (PETRONILHO et al., 2012) , tratamento de feridas (SEHN et al., 2009) e controle de microrganismos patogênicos (VICTORINO et al., 2009) e tratamento contra tumor (SULAIMAN et al., 2012).

A própolis é constituída principalmente de ácidos orgânicos, compostos fenólicos e algumas enzimas, vitaminas e minerais (BENKOVIC et al., 2007). Ela possui diversas propriedades dentre as quais pode ser destacado a atividade

antimicrobiana (PARK et al., 1998; FERNANDES JÚNIOR et al., 2005), antifúngica (KOÇ et al., 2011), antioxidante (AHN et al., 2007), anti-inflamatória (SILVA et al., 2012). Desta forma, devido à presença de diversos componentes bioativos, a própolis representa uma fonte em potencial de compostos ativos.

Este trabalho teve como objetivo a produção e caracterização de filmes de desintegração oral à base de gelatina incorporados com diferentes concentrações de colágeno hidrolisado e extrato etanólico de própolis. Foram avaliados os efeitos da incorporação do colágeno hidrolisado e do extrato etanólico de própolis nas propriedades dos filmes. Além disso, este trabalho verificou a estabilidade dos compostos fenólicos nos filmes em função do tempo, a fim de verificar a viabilidade desses componentes após o processamento dos filmes bem como após um determinado período de estocagem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Filmes de desintegração oral

O uso de filmes poliméricos já foi muito explorado na área farmacêutica para recobrimento de comprimidos, a fim de protegê-los e controlar a liberação de fármacos, bem como para melhorar os aspectos sensoriais, tais como aparência e sabores desagradáveis (DESHPANDE et al., 1997; OHMORI et al., 2005; PONGJANYAKUL; PUTTIPIPATKHACHORN, 2007). Entretanto, o uso dos filmes bucais pode ser preferido em relação aos comprimidos em termos de flexibilidade e conforto (MOHAMED; HAIDER; MOHAMED ALI, 2011). Além disso, comparados com outros métodos de liberação, como os géis orais, que são facilmente carregados pela salivagem, os filmes de desintegração oral possuem a vantagem do aumento no tempo de residência do composto ativo na cavidade bucal (ANDERS; MERKLE, 1989; COLLINS; DEASY, 1990; BODDUPALLI et al., 2010). Adicionalmente comparando com outros métodos de administração oral, os filmes possuem a vantagem de apresentar maior área superficial para liberação dos compostos ativos e não necessitam de água para sua administração (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Nos últimos anos vem se intensificado os estudos dos filmes poliméricos como veículos de compostos de interesse para liberação na cavidade oral (DIXIT; PUTHLI (2009). Os filmes de desintegração oral são constituídos principalmente de macromoléculas com capacidade de formação de matriz polimérica, agente plastificante, e o composto ativo de interesse (DIXIT; PUTHLI, 2009). Esses filmes podem ser produzidos utilizando-se diversos polímeros naturais e/ou sintéticos, e blendas de polímeros, formado por apenas uma camada ou multicamadas, de forma a obter as propriedades desejadas (NAGAR; CHAUHAN; YASIR, 2011). Desta forma os

filmes podem apresentar diferentes características dependendo dos componentes que são utilizados para sua produção. Na literatura podem ser encontrados filmes orais com diferentes características, como por exemplo, filmes com longo tempo de desintegração (EL-KAMEL; ASHRI; ALSARRA, 2007; ABRUZZO et al., 2012), de rápida desintegração (NISHIMURA et al., 2009; KOLAND; CHARYULU; PRABHU, 2010; DAUD; SAPKAL; BONDE, 2011), mucoadesivos (ABU-HUWAIJ; SALEM; SALLAM 2007; JAIN, 2008; MURA et al., (2010); MOHAMED; HAIDER; MOHAMED ALI, 2011; AVACHAT; GUJAR; WAGH, 2013) e com elevada (MU et al., 2012) ou reduzida (AVACHAT; GUJAR; WAGH, 2013) capacidade de intumescimento. Dixit e Puthili (2009) sugerem para manutenção do controle de qualidade dos filmes avaliação da espessura, propriedades mecânicas (tensão na ruptura e alongação), tempo de desintegração, tempo de dissolução, conteúdo e uniformidade de fármacos, avaliação sensorial e efetividade clínica.

2.1.1. Aplicações de filmes de desintegração oral

Os filmes de desintegração oral são aplicados, geralmente, quando os pacientes apresentam dificuldade na administração de outras formas de medicamentos devido à dificuldade de deglutição, náuseas ou vômito (DIXIT; PUTHLI, 2009; ALMEIDA; LOPES; CHAUD, 2012), ou apenas para melhorar o hálito, como substituto de pastilhas e balas. Comercialmente já podem ser encontrados em farmácias nacionais filmes de desintegração oral para problemas respiratórios, contendo bromidrato de dextrometorfano da marca Trimedal®. Alguns exemplos de aplicação, em função do princípio ativo utilizado, podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Exemplos de aplicações de diferentes tipos de filmes orais e princípio ativo incorporado.

Princípio Ativo	Tipo de Filmes	Aplicação do filme	Autor
Gluconato de clorexidina	Filmes mucoadesivos	Antimicrobiano	Senel et al. (2000)
Clotrimazole	Filme extrusado	Contra candidíase oral	Repka, Prodduturi e Stodghill (2003)
Cloridrato de lidocaína	Filmes mucoadesivos	Alívio de dor	Abu-Huwaij, Salem e Sallam (2007)
Dexametasona	Filme de desintegração rápida	Inflamação	Shimoda et al. (2009)
Proclorperazina	Filme de desintegração rápida	Náusea	Nishimura et al. (2009)
Losartan	Filmes mucoadesivos	Tratamento de hipertensão	Koland, Charyulu e Prabhu (2010)
Cloridrato de propanolol	Filmes mucoadesivos	Problemas cardíacos	Abruzzo et al. (2012)
Dexametasona	Filme de desintegração rápida	Náusea e enjoo	Nishigaki et al. (2012)
Benzoato de rizatriptana	Filmes mucoadesivos	Enxaqueca	Avanchat, Gujar e Wagh (2013)

Observa-se que os filmes de desintegração oral apresentam diversas aplicações. Além destes estudos outros podem ser destacados. El-Kamel, Ashiri e Alsarra (2007), por exemplo, avaliaram os filmes de desintegração oral em humanos e verificaram que a concentração de metronidazole liberada dos filmes em um intervalo de 0,25 e 6 horas mantinha uma concentração entre 5 e 15µg / mL, que está acima da concentração mínima inibitória contra bactérias anaeróbicas responsáveis por doenças periodontais, sendo estes filmes, portanto efetivos para liberação de metronidazole na cavidade oral (EL-KAMEL; ASHIRI; ALSARRA, 2007).

Daud, Sapkal e Bonde (2011) estudaram a incorporação de um princípio ativo natural (extrato de gengibre) em filmes de desintegração oral à base de hidroxipropilmetilcelulose, pullulan, acetato de polivinila e maltodextrina e verificaram a aceitação sensorial e a eficiência clínica de filmes de desintegração oral e observaram, para algumas formulações, boa aceitação sensorial tanto para textura como para sabor residual amargo e, no estudo clínico os filmes foram efetivos na redução dos sintomas de náusea e enjoo.

Nos estudos avaliando filmes orais contendo cloridrato de diltiazem, para tratamento de hipertensão, conduzidos por Mohamed, Haider e Mohamed Ali (2011), foi observado que os filmes mucoadesivos foram mais efetivos quando comparados com o medicamento na forma de comprimidos já encontrado no mercado.

Almeida, Lopes e Chaud (2012) pesquisaram filmes à base de Cekol 30 (carboximetilcelulose) contendo cloridrato de metoclopramida para redução de náuseas e vômitos, e observaram que os filmes podem ser uma alternativa útil para administração de medicamentos para pessoal com dificuldade de deglutição ou para fármacos que sofrem extensa metabolização hepática.

2.2. Produção dos filmes orais

Os filmes de desintegração oral podem ser produzidos pela técnica de “casting”, também denominada de método de evaporação de solvente (TANG et al., 2010; SIEVENS-FIGUEROA et al., 2012) ou por extrusão a quente (CILURZO et al., 2008). O primeiro método é o processo mais utilizado para a produção de filmes orais na literatura devido a sua simplicidade e baixo custo. No método de “casting” os materiais são primeiramente solubilizados em um solvente adequado, e em seguida a solução é transferida ou espalhada em um molde para a secagem (MORALES; MCCONVILLE,

2011). Para uma maior uniformidade da matriz é recomendado a eliminação das bolhas de ar da solução que podem ser formadas durante a homogeneização dos materiais (DIXIT; PUTHLI, 2009).

No processo de extrusão a quente os ingredientes são misturados e então submetidos à pressão e aquecimento, em seguida o material é forçado a passar por uma matriz onde será modelado (MORALES; MCCONVILLE, 2011). Devido às condições de processo, esse método possui a desvantagem da degradação de componentes termosensíveis, por isso a produção por evaporação de solvente é a mais utilizada (MORALES; MCCONVILLE, 2011).

Os filmes orais são constituídos principalmente de polímeros, plastificantes e o composto ativo de interesse, podendo ser incorporados outros ingredientes como flavorizantes, edulcorantes, agentes estabilizantes, pigmentos, surfactantes, agentes mucoadesivos e estimuladores de salivagem para melhorar a aceitação dos filmes (NAGAR; CHAUHAN; YASIR, 2011).

Os polímeros usados para formação da matriz polimérica podem ser naturais ou sintéticos, podendo ser combinados de maneira a garantir as propriedades desejadas aos filmes (DIXIT; PUTHLI, 2009). Para a escolha do polímero deve ser levada em consideração sua afinidade com o composto ativo de interesse e as propriedades mecânicas dos filmes, pois o filme deve ser suficientemente resistente para ser manejado e transportado sem ser danificado, além de manter o composto ativo estável até que ele seja liberado (DIXIT; PUTHLI, 2009; NAGAR; CHAUHAN; YASIR, 2011). Dentre os polímeros utilizados para produção de filmes pode-se destacar o uso da quitosana (SENEL et al., 2000; ABRUZZO et al., 2012), celulose microcristalina (NISHIMURA et al., 2009; SHIMODA et al., 2009), hidroxipropilmetilcelulose (KOLAND; CHARYULU; PRABHU, 2010; SIEVENS-FIGUEROA et al., 2012),

etilcelulose (KANGARLOU; HARIRIAN; GHOLIPOUR, 2008; KOLAND; CHARYULU; PRABHU, 2010) carboximetilcelulose de sódio (ALMEIDA; LOPES; CHAUD, 2012), maltodextrina (CILURZO et al., 2008) e gelatina (ABRUZZO et al., 2012).

Os plastificantes são utilizados na produção de filmes com a função de melhorar a flexibilidade e manuseabilidade, e para a escolha do plastificante deve-se levar em consideração a afinidade com a macromolécula da matriz e com o componente ativo a ela adicionado, de forma que o plastificante não cristalize no filme após a secagem (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Uma infinidade de compostos ativos pode ser adicionada a matriz polimérica, podendo ser natural ou sintético. São estes compostos que irão garantir a funcionalidade dos filmes de desintegração oral, como por exemplo, a adição de gluconato de clorexidina e dexametasona, que confere ação antimicrobiana e anti-inflamatória, respectivamente. Na Tabela 2 podem ser observadas algumas macromoléculas utilizadas para filmes de desintegração oral bem como os princípios ativos que foram incorporados a matriz polimérica.

Tabela 2 - Macromoléculas e componentes ativos utilizados para produção de filmes desintegração oral.

Macromolécula	Princípio ativo	Referência
Maltodextrinas, polietilenoglicol,	Piroxicam	Cilurzo et al. (2008)
Carbopol 791P	Cloridrato de lidocaína	Abu-Huwaij, Salem e Sallam (2007)
Quitosana – Alginato	Ginsenoside R1	Watanabe et al. (2009)
Polivinilpirrolidona (PVP)	Indometacina	Gaisford et al. (2009)
Celulose microcristalina, hidroxipropilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose	Prochlorperazine	Nishimura et al. (2009)
Celulose microcristalina, hidroxipropilmetilcelulose e hidroxipropilcelulose	Dexametasona	Shimoda et al. (2009)
Hidroxipropil metil celulose	Citrato de cafeína	Garsuch e Breitzkreutz (2010)
Carbopol 934P e poli(vinil álcool)	Losartan	Koland, Charyulu e Prabhu (2010)
Hidroxipropil metilcelulose, pullulan, acetato de polivinila e maltodextrina.	Extrato de gengibre	Daud, Sapkal e Bonde (2011)
Alginato de sódio, Eudragit ® hidroxipropilmetilcelulose, poli(vinil álcool), carboximetilcelulose, hidroxipropilcelulose	Cloridrato de Diltiazem	Mohamed, Haider, Mohamed Ali (2011)
Gelatina e quitosona	Cloridrato propranolol	Abruzzo et al. (2012)
Carboximetilcelulose altamente purificada (Cekol 30®)	Cloridrato de metoclopramida	Almeida, lopes e Chaud, 2012
Hidroxipropilcelulose, amido de milho, e lactose monohidratada	Donopezil	Liew, Tan e Peh (2012)
Hidroximetil celulose	Griseofulvin, naproxen e fenofibrate	Sievens-Figueroa et al. (2012)
Xiloglucano de semente de tamarindo	Benzoato de rizatripta	Avachat, Gujar e Wagh (2013)

Como pode ser observado na Tabela 2 ainda são poucos os trabalhos com incorporação de componentes ativos naturais em filmes de desintegração oral, sendo mais estudada a adição de produtos fármacos sintéticos. Devido a grande diversidade de macromoléculas, para formação das matrizes poliméricas, os filmes de desintegração oral apresentam uma boa alternativa como veículo de componentes ativos dentre os quais podem ser exploradas a utilização de fontes naturais.

2.2.1. Gelatina e sua aplicação na produção de filmes

A gelatina é uma proteína obtida pela hidrólise ácida ou alcalina do colágeno, que é o componente principal da pele, ossos e tecido conjuntivo do corpo de animais (JOHNSTON-BANKS, 1990). Suas propriedades variam de acordo com as condições do processo de hidrólise, e por se tratar de um produto derivado do colágeno, suas propriedades variam também de acordo com a fonte, o tipo e a idade do animal (WARD; COURST, 1977; GÓMEZ-ESTACA et al., 2009; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011). A gelatina possui uma variedade de cadeias peptídicas, uma vez que normalmente a hidrólise não ocorre de maneira uniforme. Assim as gelatinas não são homogêneas no que se refere à massa molecular (WARD; COURTS, 1977; JOHNSTON-BANKS, 1990). Os principais constituintes da gelatina são grandes e complexas moléculas polipeptídicas de mesma composição que o colágeno do qual foi gerado (WARD; COURSTS, 1977; JOHNSTON-BANKS, 1990; GÓMEZ-GUILLÉN et al., 2011).

A propriedade filme-formadora da gelatina vem sendo amplamente explorada em diversos estudos envolvendo a produção e caracterização de filmes biodegradáveis e/ou comestíveis para utilização em embalagem (GÓMEZ-ESTACA et al., 2011; ANDREUCCETTI et al., 2011; BODINI et al., 2013).

Na área de liberação de fármacos, Ulubayram et al. (2005) avaliaram filmes à base de gelatina para liberação de desferrioxamina para o tratamento de talassémia. O tratamento convencional para esta doença ocorre de forma subcutânea gerando diversos efeitos colaterais, no entanto os estudos de Ulubayram et al. (2005) mostraram que os filmes de gelatina, que são administrados por via oral e absorvido no intestino, podem ser uma alternativa promissória para liberação de desferrioxamina.

Abruzzo et al. (2012) pesquisaram filmes para liberação de fármaco (cloridrato de propranolol) na cavidade oral com diferentes concentrações de gelatina e quitosana, e observaram para os filmes à base apenas de gelatina melhor distribuição do fármaco na matriz quando comparado com as blendas com quitosana, o que mostra que a gelatina pode ser potencialmente utilizada para produção de filmes de desintegração oral.

2.3. Colágeno hidrolisado

O colágeno hidrolisado é obtido a partir da hidrólise enzimática da gelatina ou da fibra de colágeno (DENIS et al., 2008). Assim, como em outros processos enzimáticos, a distribuição do peso molecular, suas estruturas e, consequentemente, suas propriedades funcionais dependem das condições do processo (pH, temperatura e tempo) e da especificidade da enzima utilizada no processo (DENIS et al., 2008; GUILLERMINET et al. 2010).

A biodisponibilidade da proteína no colágeno hidrolisado é maior, se comparado com a gelatina e a fibra de colágeno, devido ao reduzido tamanho das cadeias peptídicas, o que facilita a absorção (OESSER et al., 1999, MOSKOWITZ, 2000; WU et al., 2004; IWAI et al., 2005; TIRAPEGUI; CASTRO; ROSSI, 2007; GUILLERMINET et al., 2010). Diversos estudos mostram que a ingestão de colágeno hidrolisado pode auxiliar na deficiência de cálcio e aumentar a densidade óssea (WU et

al., 2004; GUILLERMINET et al., 2010). Outros estudos mostram que o colágeno hidrolisado tem potencial para redução de radicais livres e pressão sanguínea (MORIMURA et al., 2002) e também apresenta potencial como agente hidratantes em cremes para a indústria cosmética (LANGMAIER et al., 2002).

Em estudo para utilização do colágeno hidrolisado para produção de filmes para embalagem Langmaier et al. (2008) avaliaram a incorporação de colágeno hidrolisado em embalagens comestíveis biodegradáveis de amido e verificaram que o mesmo pode ser utilizado para controlar o tempo de liberação do composto ativo do filme. Pei et al. (2013) avaliaram filmes à base de celulose e incorporados com colágeno hidrolisado visando a aplicação farmacêutica e verificaram que os filmes poderiam suportar a adesão e proliferação celular, mostrando boa biocompatibilidade.

2.4. Mecanismos de absorção de componentes ativos

A absorção de componentes e nutrientes pode ser realizada por duas vias: transdérmica e transmucosa (HEARNDEN et al., 2012). A via transdérmica também conhecida como via cutânea é uma forma muito comum de administração de medicamentos, devido à facilidade de aplicação que, na maior parte das vezes, é indolor (RANADE; HOLLINGE, 2003). A superfície da pele possui uma longa extensão com fácil acesso, que a torna um bom local para absorção de nutrientes, em contra partida, o tecido cutâneo possui a desvantagem da dificuldade na permeabilidade dos compostos ativos através camada queratinizada da parte mais externa da pele (HEARNDEN et al., 2012).

As vias transmucosas mais estudadas incluem os tecidos pulmonares, gastrointestinal, vaginal, retal, ocular e bucal, sendo as mucosas retal, vaginal e ocular

as vias com menor aceitação pelo pacientes, além disso, eles se restringem principalmente a liberação de fármacos para doenças locais (HEARNDEN et al., 2012).

Os pulmões apresentam uma grande superfície de absorção. A administração de fármacos na mucosa pulmonar é comumente utilizada para o tratamento de asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, fibrose cística e outras doenças respiratórias (CROOKS; AL-GHANANEEM, 2003).

De maneira geral, os comprimidos e capsulas ainda são as formas de dosagem mais preferidas para a maioria dos agentes terapêuticos devido à conveniência de administração, maior aceitação dos pacientes e custo (HIRANI; RATHOD; VADALIA, 2009). Muitos comprimidos hoje utilizados passam pelo trato gastrointestinal, por isso a eficiência do processo de absorção depende das características físico-químicas do medicamento, como por exemplo, estabilidade e solubilidade em condições ácidas e alcalinas, assim como as variáveis fisiológicas tais como tempo de trânsito no trato gastrointestinal (RANADE; HOLLINGER, 2003).

Uma alternativa é a absorção dos componentes pela mucosa bucal, pois esta região é ricamente vascularizada (Figura 1), o que facilita o processo de absorção de fármacos (HEARNDEN et al., 2012). A absorção pode ocorrer tanto pela via sublingual (região a baixo da língua) quanto pela via bucal (região lateral da cavidade oral), sendo a região sublingual a mais permeável (CAMPISI et al., 2010; HEARNDEN et al., 2012). Esta absorção pode ocorrer de duas maneiras (Figura 1): por rota intracelular (por dentro das células); ou por rota extracelular (por fora das células) (MORALES; MCCONVILLE, 2011). A via de administração oral vem ganhando destaque por permitir a administração em pacientes com dificuldade de deglutição, náuseas e vômitos (ALMEIDA; LOPES; CHAUD, 2012). Além disso, o composto, quando é absorvido na cavidade oral, evita a passagem por todo o trato gastrointestinal, evitando assim a

degradação devido a ação enzimática e variações do pH, além de evitar o metabolismo de primeira passagem, garantindo uma maior estabilidade do componente, aumentando sua biodisponibilidade (HEARNDEN et al., 2012).

Figura 1 - Esquema da estrutura do tecido da mucosa oral, com ilustração das diferentes vias de absorção de drogas por esta mucosa. (Fonte: Adaptada de HEARNDEN et al., 2012)

2.5. Veículos de liberação oral

Atualmente podem ser encontrados diferentes veículos de liberação oral. Entre eles pode-se citar os comprimidos (BRUSCHI et al., 2007; PERIOLI et al. 2007; CHANSANROJ; BETZ, 2010), géis (SENEL et al., 2000; MURDAN; ANDRÝSEK; SON, 2005; HUANG; XIAO; LANG, 2012), sprays (CIRRI; MURA; MORA, 2007), pastas (ORTEGA et al., 2007), adesivos (GIBSON et al., 2007) e filmes orais (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Os comprimidos ou pastilhas são muito utilizados comercialmente. São formulações sólidas que se dissolvem na saliva e utilizam toda a superfície da cavidade

oral para absorção (PADERNI et al., 2012). O problema dos comprimidos está na variação da liberação de fármacos devido às diferenças na salivação e deglutição accidental que reduz o tempo de exposição dos componentes para absorção, e uma alternativa para este problema foi o desenvolvimento de formulações mucoadesivas, que permitem um tempo mais prolongado de liberação e ação do composto ativo, além de serem mais confortáveis (PERIOLI et al., 2007).

A administração de medicamentos por spray e soluções, quando comparada com comprimidos, ocorre de maneira mais rápida, uma vez que não é necessária a desintegração para começar o processo de absorção (CIRRI; MURA; MORA, 2007). No entanto, esse processo possui o inconveniente da rápida redução da concentração de composto ativo na boca devido ao processo de salivação, desta forma, os medicamentos na forma líquida devem conter princípios ativos de rápida absorção (MCNALLY; PARK, 2007). Em alguns casos as soluções são utilizadas para gargarejos, sendo neste caso utilizados principalmente para doenças da gengiva e periodontal (BONITO; LUX; LOHR, 2005; AUTIO-GOLD, 2008), bem como antisséptico bucal (MEILLER et al., 2005).

Os filmes possuem a vantagem da facilidade de transporte e manuseio (DIXIT; PUTHLI, 2009). Produzidos na forma de desintegração rápida ou mucoadesiva apresentam boa aceitação dos pacientes com dificuldade de deglutição (ALMEIDA; LOPES; CHAUD, 2012). Podem apresentar diversas funcionalidades como, por exemplo, para tratamento de hipertensão (MOHAMED; HAIDER; MOHAMED ALI, 2011), atividade anti-inflamatória (SHIMODA et al., 2009) e antimicrobiana (DAUD; SAPKAL; BONDE, 2011).

2.6. Produtos naturais para uso medicinal

O emprego de produtos naturais como fonte de compostos ativos para aplicação medicinal é uma prática milenar, podendo ser utilizado na forma de chás, infusões ou como matéria prima para produção de extratos ou óleos essenciais para produção de pomadas e cremes (JORDAN; CUNNINGHAM; MARLES, 2010). Apesar de ser uma prática muito antiga, os produtos naturais ainda são utilizados mundialmente como fonte de recurso terapêutico eficaz (JORDAN; CUNNINGHAM; MARLES, 2010; GAHUKAR, 2012).

Muitas plantas, especiarias e outras fontes naturais reúnem diversas substâncias com diferentes funcionalidades, como por exemplo, atividade antioxidantes (MUSSATTO et al., 2011; LU et al., 2011), modulação de enzimas de desintoxicação (NA; SURH, 2008), estimulação do sistema imune (SFORCIN, 2007), redução da agregação plaquetária (KEEVIL et al., 2000), modulação do metabolismo hormonal (DUNCAN et al., 1999), atividade antimicrobiana (ESCUREDO et al., 2012) e antiviral (SUÁREZ et al., 2010).

As substâncias ativas podem agir isoladamente ou conjuntamente, sendo que neste último caso o efeito sinérgico pode, muitas vezes, superar os efeitos obtidos pelos compostos ativos isolados (GILBERT; ALVES, 2003; KEITH; BORISY; STOCKWELL, 2005; HEMAISWARYA; KRUTHIVENTI; DOBLE, 2008).

Outro fator que vem despertando a preocupação da sociedade científica está relacionado ao surgimento de microrganismos resistentes a compostos químicos devido à utilização indiscriminada destes compostos por longos anos (TEUBER, 1999; ANDREMONT, 2001; RASKIN et al., 2002). Pensando nisso os extratos e infusões de produtos naturais possuem a vantagem de diversidade de compostos ativos presentes, que, em muitos casos, aumenta a efetividade, e também reduz os riscos de resistência de

microrganismos a esses produtos (ALIGIANNIS et al., 2001; RODRIGUES, 2002). Desta maneira o estudo científico mais detalhado em relação aos diversos produtos de uso popular tem ganhado destaque nos últimos anos.

Na Tabela 3 podem ser observados alguns dos produtos naturais que são normalmente utilizados na medicina popular e suas propriedades funcionais comprovadas cientificamente.

Tabela 3 - Produtos naturais e suas propriedades medicinais.

Produto	Funcionalidade	Referência
Alecrim	Atividade anticarcinogênica	Nabekura et al. (2012)
	Atividade antimicrobiana e antioxidante	Ojeda-Sana et al. (2013)
Alho	Antioxidante, prevenção de doenças cardiovasculares, inibição da agregação de plaquetas, anticarcinogênica, aumento da circulação sanguínea e tratamento de artrite (processo inflamatório)	Rahman (2003)
Camomila	Antimicrobiano, antioxidante, antimaláricos, anti-mutagênicas, anti-inflamatória, anti-carcinogênica.	Petronilho et al. (2012)
Canela	Atividade anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, prevenção de doenças cardiovasculares e diabetes, e efeito imunomodulador.	Gruenwald, Freder e Armbruester (2010)
Cúrcuma	Atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antimicrobiana, anticarcinogênica e efeito imunomodulador.	Maheshwari et al. (2006)
Gengibre	Atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica e efeito contra enjoo, náusea, vômito e diarreia.	Kurra e Rao (2012)
Própolis	Atividade anti-inflamatório, antimicrobiana, antiviral, anticerginogênica, contra doenças respiratórias e efeito cicatrizante e imunomodulador	Sforcin e Bankova (2011)

Os componentes ativos presentes em produtos naturais para uso medicinal podem ser divididos em diferentes grupos, sendo que cada grupo apresenta ações

biológicas diferenciadas (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Um grupo de grande interesse nas pesquisas são os compostos fenólicos devido a grande variedade de componentes presentes na natureza e as suas diversas funcionalidades ao homem (NACZK; SHAHIDI, 2003).

2.6.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são um grupo de metabólicos secundários encontrados com grande frequência na natureza como fenólicos simples, ácidos fenólicos, antocianinas, derivados do ácido cinâmico e flavonoides, e nas plantas esses compostos são responsáveis pela estabilidade oxidativa endógena dos vegetais (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Os compostos fenólicos podem apresentar diversas funcionalidades como, por exemplo, atividade antimicrobiana (ESCUREDO et al., 2012; SILVA et al., 2012), antiviral (SUÁREZ et al., 2010), anticarcinogênica (CARVALHO et al., 2011; LIU et al., 2012) e antioxidante (SU; WANG; LIU, 2009; USSATO et al., 2011). A concentração dos fenólicos nos vegetais vai depender da maturidade e parte da planta, das condições ambientais em que foi cultivada e as condições de armazenamento (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Dentre os compostos fenólicos, o grupo dos flavonoides é um dos grupos mais extensos, com mais de 6.000 diferentes tipos já conhecidos (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Os flavonoides são responsáveis pela pigmentação de diversos vegetais e possuem a estrutura básica C6-C3-C6 (Figura 2), formada por dois anéis fenis (A e B) ligados entre si, que dão origem a diversas outras estruturas como é mostrado nas Figuras 3 (BOBBIO; BOBBIO, 2003; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). Alguns flavonoides, como as antocianinas podem agir como

pigmentos responsáveis pelas cores vermelha e azul em flores e frutos que atraem insetos polinizadores (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

Figura 2 - Estruturas básicas do flavonoide. (Fonte: DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Figura 3 - Algumas estruturas básicas de flavonoides importantes. (Fonte: DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Em estudos sobre a funcionalidade dos flavonoides, Chang et al. (2008) avaliaram a ação *in vitro* de um flavonoide derivado da apigenina contra câncer de ovário e obtiveram resultados satisfatórios, uma vez que o mesmo foi eficaz contra o câncer e apresentou baixa toxicidade em células saudáveis.

Lakshmi et al. (2010) analisaram a ação de 6 flavonoides (crisina, flavona, hesperetina, naringenina, naringina e rutina) contra *Brugia malayi*, que causa a filariose, e verificaram que eles foram eficazes no controle do parasita.

Jin e Yin (2012) obtiveram extrato de folhas de bambu rico em flavonoides e avaliaram o seu potencial antioxidante em ratos, os resultados obtidos mostram que os flavonoides extraídos apresentam alta atividade antioxidante (*in vivo*).

Silva et al. (2012) avaliaram o perfil de compostos fenólicos de amostras de própolis de Portugal e verificaram que as amostras, que apresentaram maior teor de compostos fenólicos, também apresentaram valores mais elevados de atividade anti-inflamatória e antioxidante, o que mostra que esses compostos estão diretamente relacionados com estas propriedades funcionais.

2.6.2. Própolis

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas a partir de diversas partes e exsudados de plantas e vegetais (SFORCIN; BANKOVA, 2011). De maneira geral, a própolis é composta, em média, por 55% de resinas e bálsamos, 30% de cera, 10% de pólen e metabólitos secundários, incluindo flavonoides, ácidos fenólicos, além de minerais (MATSUNO, 1995; MIYATAKA et al., 1997). Mais de 200 compostos já foram identificados em diferentes amostras, incluindo compostos fenólicos (BARBARIĆ et al., 2011; CARVALHO et al., 2011; SULAIMAN et al., 2011; SILVA et al., 2012), e terpenos (β -esteroides, aldeídos aromáticos e álcoois,

sesquiterpenos, naftaleno e derivados do estilbeno) (AGA et al., 1994; MARCUCCI, 1995; MOHAMMADZADEH et al., 2007), que garantem suas propriedades funcionais.

Por se tratar de um produto produzido de resíduos e fragmentos de vegetais a própolis apresenta uma grande variação na composição, dependendo da espécie da abelha e da vegetação da região em que a própolis é produzida (SFORCIN; BANKOVA, 2011). Sulaiman et al. (2011) realizaram a caracterização química da própolis de diferentes regiões do Iraque e identificaram 38 compostos dentre os quais 33 eram compostos fenólicos. Dentre os compostos encontrados por Sulaiman et al. (2011) foram encontrados predominantemente ácidos fenólicos e seus ésteres, seguido de flavonas, flavonóis, flavononas e dihidroflavonóis. Frozza et al. (2013) avaliando própolis do nordeste brasileiro identificaram como componentes principais as isoflavonas, formononetina e biochanina. Outros fatores que podem influenciar na composição do extrato de própolis produzido são as condições de extração e o solvente utilizado (MELLO; HUBINGER, 2012).

Diversos estudos têm mostrado que o extrato de própolis possui atividade cicatrizante (SEHN et al., 2009), anti-inflamatória (SILVA et al., 2012), antioxidante (AHN et al., 2007; GREGORIS; STEVANATO, 2010), antiviral (SUÁREZ et al., 2010), anestésica (MANARA et al., 1999), antifúngica (MARTINS et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006), antitumoral (VALENTE et al., 2011; SULAIMAN et al., 2012), anti-séptica (GARCIA et al., 2004), antibacteriana (SANTOS, 2003; COELHO et al., 2004; VARGAS et al., 2004; CHOUDHARI et al., 2012) e anticariogênica (ALMEIDA et al., 2006).

Muitos estudos mostram que o extrato etanólico de própolis é eficiente contra bactérias patogênicas (SANTOS et al. 2002; SONMEZ et al., 2005; KORU et al., 2007). A própolis age sobre a membrana citoplasmática, reduzindo a mobilidade e inibindo a

atividade enzimática de bactérias (MIRZOEVA et al., 1997). Boyanova et al. (2006) observaram que a própolis foi eficiente no controle de 94 bactérias anaeróbicas patogênicas isoladas de pacientes com diferentes infecções. Mohammadzadeh et al. (2007) avaliaram a eficiência contra bactérias e fungos como, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Aspergillus niger*.

Entre os estudos visando a aplicação da própolis, Ceschel et al. (2002) produziram um gel com adição de própolis e avaliaram o efeito na mucosa bucal de suíno. Foi verificado que a própolis apresentou capacidade de permear as células da mucosa, podendo então ser utilizada no controle de problemas bucais (CESCHEL et al., 2002). Bruschi et al. (2007) avaliaram a produção de um sistema semissólido com própolis para tratamento de periodontite encontrando características satisfatórias do material (comportamento mecânico e reológico, teor adequado de própolis e possibilidade de controle da liberação da própolis), sendo necessário alguns testes clínicos para comprovação de sua eficiência. Juliano, Pala e Cossu (2007) produziram filmes incorporados com extrato de própolis à base de alginato, ágar e blendas de ágar com quitosana, e verificaram que os filmes apresentaram boa atividade antimicrobiana e concentração de compostos fenólicos, o que demonstra que estes filmes podem ser utilizados para o tratamento de doenças bucais.

Outros estudos avaliaram o uso da própolis para a produção de filmes para embalagens ativas. Pastor et al. (2010) avaliaram a incorporação de extrato de própolis em filme para embalagem e verificaram que o mesmo apresentou boa atividade antifúngica contra *A. niger*. Mascheroni et al. (2010) avaliaram embalagens aditivadas com própolis e obtiveram resultados satisfatórios que demonstraram a potencialidade do uso da própolis para produção de embalagens ativas com ação antimicrobiana. Bodini et al. (2013) estudaram diversas propriedades de filmes biodegradáveis incorporados com

extrato de própolis e verificaram que o aumento da concentração do extrato melhorou as propriedades de barreira ao vapor de água e que nas maiores concentração de própolis analisadas foi detectado atividade antimicrobiana dos filmes contra *S. aureus*. Além disso, os filmes de Bodini et al. (2013) apresentaram boa estabilidade mantendo a concentração de compostos fenólicos e a atividade antimicrobiana durante o período de armazenamento (177 dias).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Para a produção do extrato etanólico de própolis foi utilizada a resina do tipo 12 (Star Rigel, Raffard – SP) e álcool etílico absoluto (Synth). Os filmes foram produzidos com gelatina suína comercial do tipo A (260 Bloom/ 40 MESH/ Lote: LFP 7466 P 11) e colágeno hidrolisado (B50), adquiridos da empresa GELITA do Brasil Ltda. (São Paulo, Brasil). O plastificante utilizado foi o sorbitol (Nuclear). Para análise de compostos fenólicos foram utilizados os reagentes Folin-Ciocalteu (Sigma – Aldrich), carbonato de sódio anidro (Synth) e padrão de ácido gálico (Sigma – Aldrich). Para produção da solução tampão fosfato salino foram utilizados cloreto de sódio (Synth), cloreto de potássio (Synth), fosfato de potássio monofásico (Synth), fosfato de sódio bibásico (Synth) e ácido clorídrico (Synth).

3.2. Produção da solução tampão fosfato salino (pH = 6,8)

A solução tampão fosfato salino foi produzido de acordo com Föger et al. (2008). Foram pesados 8 g de cloreto de sódio (NaCl); 0,2 g de cloreto de potássio (KCl), 1,54g de fosfato de sódio bibásico (Na_2HPO_4) e 0,2 g de fosfato de potássio monofásico (KH_2PO_4), dissolvidos de água destilada em balão volumétrico, e o volume completado para 1 L. A correção do pH (6,8), foi realizada com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M.

3.3. Produção do Extrato etanólico de própolis

O extrato etanólico de própolis foi produzido de acordo com metodologia proposta por Nori et al. (2011) utilizado uma proporção de 30 g de resina/100 mL de

álcool etílico (80%). A extração foi realizada sob agitação mecânica (500rpm, 30 minutos), na temperatura de 50°C (Figura 4). A solução foi então resfriada e armazenada sob refrigeração por 24h. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro e o extrato etanólico de própolis foi armazenado por no máximo 7 dias sob refrigeração.

Figura 4 - Processo de produção do extrato etanólico de própolis.

3.3.1. Rendimento de sólidos totais

O rendimento de sólidos totais (RST) foi determinado gravimetricamente conforme metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). Amostras de extrato etanólico de própolis (10mL) foram colocadas em cadinhos previamente pesados e secos. O sistema (cadinho + extrato) foi seco em estufa (Estufa 515, FANEM) à 105°C por 2 horas. Após resfriamento os cadinhos foram novamente pesados e o RST foi calculado utilizando-se a eq. (1).

$$RST = \frac{m_f}{v} 100 \quad (1)$$

Onde: RST = rendimento de sólidos totais (g/mL); m_f = massa seca final (g); e v = volume de extrato (mL).

3.3.2. Concentração de compostos fenólicos

A concentração de compostos fenólicos do extrato etanólico de própolis foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu segundo Singleton, Orthofer e Lamuela-

Raventós (1999) utilizando como padrão ácido gálico. O extrato etanólico de própolis foi diluído em álcool pura (1:1000) e uma alíquota de 0,5 mL desta solução foi adicionada em um tubo contendo 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10). O tubo foi homogeneizado e mantido em repouso por 5 minutos na ausência de luz, em seguida foi adicionada à solução 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (4%). A solução foi homogeneizada e mantida em repouso por mais 2 horas. A leitura da absorbância foi realizada a 740 nm, e convertida e expressa em mg de ácido gálico/g de extrato usando a curva padrão de ácido gálico.

3.3.3. Parâmetros de cor

O extrato foi avaliado em relação aos parâmetros de cor utilizando-se um colorímetro Miniscan XE (HunterLab). Amostra do extrato etanólico de própolis (50 mL) foi colocada em recipiente de quartzo para leitura. Os parâmetros de cor foram determinados pelo software do equipamento – *Universal software* (HunterLab Associates Laboratory, 1997). A leitura foi coletada em 10 pontos de cada amostra de extrato em triplicata.

3.4. Produção dos filmes de desintegração oral

Os filmes de desintegração oral foram produzidos pela técnica de “casting”. A produção dos filmes foi realizada conforme fluxograma mostrado na Figura 5. A concentração de gelatina e colágeno hidrolisado (m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado = 2g /100g de solução) e plastificante (30 g de sorbitol /100g de m_{G+CH}) foram mantidas constantes. A gelatina e o colágeno hidrolisado foram hidratados em água destilada por 30 minutos à temperatura ambiente, em seguida foram solubilizados em banho termostatizado (MA 159, Marconi) à 50°C por 10 min. O sorbitol,

previamente solubilizado em água, foi adicionado à solução sob agitação magnética (SL-91, Solab) por 1 minuto. A solução foi mantida à 50 °C por mais 10 min para completa solubilização. O extrato foi adicionado em diferentes concentrações e a solução homogeneizada em ultraturrax (IKA, T25) por 1 min à 6000 rpm. Após esta etapa a solução foi mantida em banho ultrassom (UltraCleans 1400^a, Unique) por 2 minutos. A solução foi então dispersada em placa e em seguida submetida à secagem em estufa de circulação forçada (Estufa MA-035, Marconi) à 30°C por 24h. A espessura dos filmes foi mantida constante ($0,070 \pm 0,007$ mm) através do controle da relação de massa/área do suporte.

Figura 5 - Fluxograma de produção de filmes de desintegração oral à base de gelatina e colágeno hidrolisado contendo extrato etanólico de própolis (EEP) pela técnica de “casting”.

As formulações de filmes de desintegração oral foram produzidas com diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (0, 10, 20 e 30g / 100g de m_{G+CH}) e extrato etanólico de própolis (0, 100 e 200g / 100g de m_{G+CH}). As formulações estudadas podem ser observadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Formulações de filmes de desintegração oral em relação à concentração de gelatina (GE), colágeno hidrolisado (CH) e extrato etanólico de própolis (EEP).

Tratamento	GE (g/100g de solução)	CH (g/100g de solução)	EEP (g/100g de proteína)
1	2,0	0	0
2	2,0	0	100
3	2,0	0	200
4	1,8	0,2	0
5	1,8	0,2	100
6	1,8	0,2	200
7	1,6	0,4	0
8	1,6	0,4	100
9	1,6	0,4	200
10	1,4	0,6	0
11	1,4	0,6	100
12	1,4	0,6	200

Anteriormente às análises, os filmes de desintegração oral foram acondicionados em dessecadores contendo solução salina saturada de brometo de sódio (UR = 58%) a temperatura ambiente ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), por um período de 5 dias, antes de serem submetidos às análises. Para as análises de grau de intumescimento, espectroscopia de infravermelho e microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram armazenadas em dessecadores com sílica por 10 dias para posterior análise.

A espessura dos filmes foi avaliada utilizando-se micrometro eletrônico (Mitutoyo - Japão) com precisão de $\pm 0,001$ mm.

3.5. Caracterização dos filmes de desintegração oral

3.5.1. Cor e opacidade

Os filmes de desintegração oral foram caracterizados quando a cor e opacidade utilizando o colirímetro Miniscan XE (HunterLab), com iluminante D65, controlado pelo programa computacional *Universal Software*.

A determinação dos parâmetros de cor foi realizada segundo metodologia descrita por Gennadios et al. (1996) utilizando o sistema CIE Lab (Comisson Internationale de Eclairage) com a determinação dos parâmetros L^* , a^* e b^* , onde L^* corresponde à luminosidade (0 = preto e 100 =branco), croma a^* corresponde à variação de cor do verde (-) ao vermelho (+) e croma b^* que varia do azul (-) ao amarelo (+).

A opacidade foi determinada conforme Sobral (2000) utilizando-se a eq. (2). A leitura foi realizada em 3 pontos aleatórios de cada amostra de filme (25 cm²) em triplicata.

$$Opa = \frac{Y_p}{Y_b} \quad (2)$$

Onde: Opa = opacidade (%); Y_p = opacidade da amostra colocada sobre o padrão preto;

Y_b = opacidade da amostra colocada sobre o padrão branco.

3.5.2. Matéria total solúvel

A matéria total solúvel foi determinada gravimetricamente de acordo com Gontard et al. (1994). Para determinação da matéria total solúvel os filmes de desintegração oral amostras de 2,0 cm de diâmetro foram utilizadas. As amostras previamente pesadas foram imersas em 50 mL de água destilada e este sistema (água +

amostra de filme) foi mantido sob agitação constante (63 rpm) por 24 h à 25 °C . Após este período os filmes foram retirados da solução e secos em estufa à 105°C até peso constante. A matéria total solúvel foi calculada utilizando-se a eq. (3). A análise foi realizada em triplicata.

$$MS = \frac{m_i - m_f}{m_i} 100 \quad (3)$$

Onde: MS = porcentagem de matéria total solúvel (%); m_i = massa inicial da amostra (g); e m_f = massa final da amostra (g).

3.5.3. Umidade

A umidade dos filmes foram determinados de acordo com a metodologia descrita por Gontard et al. (1994). Amostras dos filmes foram pesados em pesa filtros, previamente secos e pesados, e submetidas à secagem (105 °C) até peso constante. A umidade foi calculada conforme eq. (4)

$$U = \frac{m_i - m_f}{m_i} 100 \quad (3)$$

Onde: U = umidade dos filmes (%); m_i = massa inicial da amostra (g); e m_f = massa final da amostra (g).

3.5.4. Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microestrutura interna foi realizada conforme Carvalho e Grosso, (2004). As amostras de filmesm foram fraturadas utilizando nitrogênio líquido e recobertas com ouro para análise. As amostras foram observadas em microscópio

eletrônico de varredura modelo LEO 440i (Eletron Microscopy, Cambrige, Inglaterra) a 20 kV, utilizando-se um aumento de 6.000 x.

3.5.5. Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas pelo teste de tração segundo a metodologia ASTM (D 882-10), utilizando-se texturômetro TA.XT.Plus (Stable Microsystems SMD, Inglaterra). Os filmes de desintegração oral foram cortados em tiras de 25 x 100 mm. Os filmes foram fixados em probe específico para análise de tração, e a distância inicial e velocidade do teste foram mantidos constantes em 100mm e 50 mm/min, respectivamente. Os filmes foram tracionados até a ruptura, gerando uma curva de tensão (MPa) por elongação (%), onde foram coletados os dados de tensão na ruptura e elongação. A análise foi realizada com 10 replicatas.

3.5.6. Mucoadesividade *in vitro*

A mucoadesividade *in vitro* foi determinada conforme Bruschi et al. (2007), utilizando pele galinha, adquirida em comércio local, para simular a cavidade bucal. A análise foi realizada utilizando-se um texturômetro TA-XT Plus (Stable Micro Systems), e um probe cilíndrico com diâmetro de 20mm. As amostras de filmes foram fixadas na plataforma do texturômetro enquanto a pele foi afixada no probe cilíndrico (Figura 6). Antes da análise a pele de galinha foi hidratada por 30 segundos em solução tampão fosfato salino (pH = 6,8) à 37°C e o excesso de solução foi removido com papel filtro. A amostra foi comprimida pelo probe coberto com pele a uma força constante (0,1N) por 30 segundo. Posteriormente a amostra e pele foram completamente separadas com velocidade constante (1 mm/s). A mucoadesividade foi determinada

como a força máxima necessária para a separação da amostra a partir da curva força versus tempo. Para cada formulação foram realizadas pelo menos cinco repetições.

Figura 6 - Representação da análise de mucoadesividade dos filmes de desintegração oral. (Fonte: Adaptada de MORALES; MCCONVILLE, 2011)

3.5.7. Ângulo de contato

A determinação do ângulo de contato entre uma gota de água e o filme de desintegração oral (Figura 7) foi realizado por método ótico, utilizando-se de um tensiomêtro ótico (Attension, Theta Lite Optical Tensiometer), de acordo com Silva et al. (2007). Amostras do filme (20 x 40 mm) foram fixadas na base do equipamento e uma gota de água deionizada foi depositada na superfície do filme utilizando-se uma seringa. O ângulo de contato foi calculado utilizando o software do aparelho no tempo de 30 segundos.

Figura 7 – Ângulo de contato (ϕ) pelo método da gota.

3.5.8. Tempo de desintegração

O teste de desintegração foi realizado conforme descrito por Perumal et al. (2008), em solução tampão fosfato salino (pH = 6,8) para simular as saliva. Amostras dos filmes de desintegração oral (3,5 x 2,2 cm) foram colocadas em 100 mL de solução tampão fosfato a 37 °C e mantidas sob agitação (100 rpm/min) utilizando-se uma mesa agitadora com controle de temperatura (Shaker MA-420, Marconi). O tempo de desintegração foi determinado como o tempo necessário (min) para o filme desintegrar na solução.

3.5.9. Grau de intumescimento

A análise de grau de intumescimento foi realizada conforme Mohamed, Haider e Mohamed Ali (2011) com algumas modificações. As amostras de filme (2 cm de diâmetro) foram previamente colocadas em dessecadores contendo sílica gel por 10 dias. Após este período as amostras de filme foram imersas em 30 mL de solução tampão fosfato salino (pH 6,8) à 37°C em suporte apropriado para pesagem. As amostras então foram retiradas em intervalos de 30 segundos e então pesadas. O grau de intumescimento (%) foi determinado de acordo com a eq. (5)

$$GI = \frac{m_i - m_f}{m_i} 100 \quad (5)$$

Onde: GI = grau de intumescimento (%), m_i = massa inicial da amostra (g), m_f = massa úmida nos diferentes tempos da amostra (g).

3.5.10. Concentração dos compostos fenólicos

A concentração de compostos fenólicos totais no filme de desintegração oral foi determinada utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Amostras de filmes (entre 9 e 12 mg) foram solubilizadas em 6 mL de água destilada à 50°C por 50 min. Após este período foi dissolvida em 4 mL de álcool (80%) e esta solução foi homogeneizada e mantida à 50°C por 10 min. Foram retiradas alíquotas de 0,5 mL desta solução e colocadas em tubos contendo 2,5 mL de reagente de Folin (1:10), após 5 minutos de repouso foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 4 %. Após 2 horas de repouso na ausência de luz foi realizada a leitura da absorbância à 740 nm. Os valores da absorbância foram convertidos em mg ácido gálico /g de filme utilizando-se a curva padrão.

3.5.11. Liberação *in vitro*

A cinética de liberação foi realizada de acordo com Perumal et al. (2008). Amostras de filmes de desintegração oral (2,2 x 3,5 cm) foram colocadas em solução tampão fosfato salino (pH 6,8) à 37°C e mantidas sob agitação à 100 rpm. Em intervalos de tempo de 0, 2, 3, 4, 5, 10 e 15 minutos, alíquotas de 0,5mL foram retiradas da solução para análise de fenóis totais pelo método de Folin-ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A análise foi realizada em triplicata.

3.5.12. Cinética de liberação

A cinética de liberação dos compostos bioativos foi determinada pela eq. (6) desenvolvida por Kormeyer e Peppas (1981). A determinação dos parâmetros desta equação foi realizada utilizando-se os dados encontrados na análise de liberação *in vitro* no programa computacional *Statistica* (Versão 11).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (6)$$

Onde: M_t/M_∞ = fração de fármaco liberada ao longo do tempo (t) ; k = constante cinética, que incorpora as características estruturais e geométricas do mecanismo; e n = expoente de liberação para a liberação do fármaco.

3.5.13. Calorimetria diferencia de varredura (DSC)

As propriedades térmicas dos filmes (temperatura de fusão e entalpia de fusão) foram avaliadas por calorimetria diferencial de varredura de acordo com Sobral et al. (2001), utilizando-se DSC TA2010 controlado por um modulo TA4000 (TA Instruments, USA) com um acessório de resfriamento. Amostras (aproximadamente 10 mg) foram pesadas em balança de precisão ($\pm 0,0001$ g) e armazenadas em recipiente hermético por 3 semanas, onde foram aquecido de -150 à 150 °C à 5 °C/ min em atmosfera inerte (45 mL / min de N₂). Um recipiente vazio foi utilizado como referência.

A temperatura de fusão (T_m) foi calculada onde ocorreu o pico endotérmico. As propriedades foram calculadas com auxílio do software Universal Analysis V1.7F (TA Instruments) e as análises foram realizadas em triplicata.

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

As interações entre os componentes dos filmes de desintegração oral (a gelatina, o colágeno hidrolisado e a própolis) foram avaliadas através de análises de espectroscopia de infravermelho, utilizando o espectrofotômetro Perkin Elmer (Spectrum One FT-IR) de acordo com Vicentini et al. (2005). Foram realizadas varreduras (16 varreduras no ponto) na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 2 cm^{-1} . Os arquivos foram convertidos em arquivos numéricos e analisados utilizando-se o programa *FTIR Spectrum Software*.

3.5.15. Microbiologia

A atividade antimicrobiana dos filmes de desintegração oral foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* utilizando-se o método de disco difusão descrito na Norma M7-A6 (NCCLS, 2003) com algumas modificações. A bactéria foi ativada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) por 24h à 37°C. Após a incubação a solução foi padronizada em espectrofotômetro utilizando a solução de 0,5 de McFarland à 625nm, para obtenção de uma solução com concentração de aproximadamente 10^8 células / mL e, posteriormente esta solução foi então diluída para 10^7 células / mL. Alíquotas (0,1 mL) desta última solução foram espalhadas com alça de drigalski em uma placa contendo ágar nutriente. Amostras dos filmes de desintegração oral (2 cm de diâmetro) foram colocadas sobre a superfície da placa inoculada. Placas com filme sem adição de extrato etanólico de própolis foram utilizadas como controle negativo. A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação do halo de inibição formado (cm) após 24h de incubação à 37°C considerando o diâmetro do filme. A análise foi realizada em duplicata.

3.6. Análise de estabilidade

Para análise de estabilidade, amostras de filmes foram armazenadas à temperatura ambiente em dessecadores contendo solução saturada de NaBr (UR = 58%) com intensidade constante de luminosidade (igual à $155,0 \pm 28,5$ lux). A estabilidade dos filmes foi avaliada em relação à variação da concentração de compostos fenólicos totais em função do tempo. A concentração de desses compostos foi determinada pelo método de Folin-ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) nos tempos de armazenamento de 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas.

3.7. Análise estatística

Os dados foram avaliados estatisticamente utilizando a análise de variância (ANOVA) e em caso de diferença significativa foi realizado o teste de média utilizando o teste de Duncan ($p < 0,05$), utilizando-se o programa computacional SAS 9.2.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização do extrato etanólico de própolis

Os resultados relacionados à caracterização do extrato etanólico de própolis podem ser observados na Tabela 5.

Os valores encontrados para concentração de compostos fenólicos (Tabela 5) foram próximos ao observado por Bodini et al. (2013), que verificaram uma concentração igual à $51,9 \pm 2,4$ mg de ácido gálico/g de extrato utilizando resina de própolis do tipo 12.

Tabela 5 - Concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{fenólicos}}$), rendimento de sólidos totais (RST), luminosidade (L^*), croma a^* (a^*) e croma b^* (b^*) do extrato etanólico de própolis.

Análise	EEP
$C_{\text{fenólicos}}$ (mg de ácido gálico/ g de extrato)	$55,5 \pm 1,6$
RST (g de sólidos totais/ mL de extrato)	$14,4 \pm 0,2$
L^*	$1,20 \pm 0,07$
a^*	$0,50 \pm 0,06$
b^*	$0,31 \pm 0,04$

Na literatura pode ser encontrada uma grande variedade de valores para a concentração de compostos fenólicos para extrato de própolis. Estas variações podem estar relacionadas com os diferentes tipos de própolis, a região e as condições ambientais (SFORCIN; BANKOVA, 2011), além dos processos de extração utilizados (MELLO; HUBINGER, 2012).

Kumazawa, Hamasaka e Nakayama (2004) avaliaram extratos de própolis de diferentes regiões do mundo e observaram valores entre 31,2 e 299 mg /g de extrato. De maneira similar, Ahn et al. (2007) encontraram para própolis de diferentes regiões da china, valores entre 42,9 e 302 mg/g de extrato.

Silva et al. (2012) avaliaram a concentração de compostos fenólicos em extrato de própolis obtidos pela extração com diferentes solventes, sendo que as amostras de extrato produzidas com álcool etílico (80 %) apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos ($157,31 \pm 1,52$ mg / g de extrato) seguidas dos extratos com metanol ($102,32 \pm 0,59$ mg / g de extrato) e água ($35,15 \pm 0,88$ mg / g de extrato) para própolis da região de Coimbra em Portugal.

Os resultados encontrados para rendimento de sólidos totais (Tabela 5) estão de acordo com a Instrução Normativa de nº 3 (BRASIL, 2001), que exige um RST superior à 11 % (m/v) para extrato de própolis.

Observou-se que o extrato etanólico de própolis obtido apresentou coloração marrom escura (Figura 8). Os resultados observados para os parâmetros de cor do extrato etanólico de própolis (Tabela 5, Figura 9) corroboram com o observado visualmente (Figura 8). Resultados semelhantes para os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) também foram observados por Bodini (2011) para extrato etanólico de própolis.

Figura 8 - Extrato etanólico de própolis (proporção = 30g de resina/100 mL de álcool etílico 80%, tempo = 30 min e temperatura = 50°C).

Figura 9 - Sólido de cor do sistema CIE Lab. (Fonte: adaptada de Moléculas: soluções para plastisóis. Disponível em: <http://www.moleculas.com.br/2012/11/definicao-e-controle-da-cor/>. Acessada em 12/03/2013)

4.2. Caracterização dos filmes de desintegração oral

4.2.1. Cor e opacidade

Exemplos dos filmes de desintegração oral produzidos, com e sem a adição de extrato etanólico de própolis, pode ser observados na Figura 10.

Os filmes de desintegração oral, independente da formulação, apresentaram homogeneidade (ausência de partículas insolúveis e ou zonas de descontinuidade). Em relação às diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (Figura 10) não foram observadas, visualmente, diferenças. No entanto, com a adição de extrato etanólico de própolis (Figura 10) observou-se aumento da coloração amarela dos filmes, que já era esperado devido à cor do EEP.

Figura 10 - Filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}), sendo: (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (e) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (f) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (g) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (h) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (i) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (j) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (k) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (l) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} . Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

Observou-se (Tabela 6) que a incorporação de colágeno hidrolisado provocou variações na luminosidade (L^*), croma a^* e opacidade dos filmes de desintegração oral, para algumas formulações. Resultados semelhantes foram observados por Hoque, Benjakul e Prodpran (2011b) para filmes à base de gelatina com diferentes graus de hidrólise, que relacionaram esta alteração com o aumento dos grupos aminas das proteínas mais hidrolisadas que podem ter reagido com os grupos carbonilas da gelatina.

Em relação à incorporação de extrato etanólico de própolis, verificou-se que o mesmo afetou de forma significativa os parâmetros de cor e opacidade. O aumento da concentração de EEP provocou aumento significativo, independente da concentração de colágeno, na luminosidade (L^*), croma b^* e opacidade (Tabela 6). Em relação ao croma a^* o aumento da concentração de EEP provocou redução significativa deste parâmetro. Os resultados observados estão relacionados com a cor característica do extrato incorporado. Observou-se que o aumento da concentração de EEP provocou aumento da intensidade de coloração amarela nos filmes (Figura 10) que também pode ser observada pelo aumento nos valores do croma b^* (Tabela 6), o que corrobora com o observado no sólido de cor (Figura 9).

Tabela 6 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) e opacidade dos filmes.

C_{EEP}	C_{CH}	L^*	a^*	b^*	Opacidade
0	0	89,80±0,96 ^{a A}	-0,98±0,06 ^{a A}	1,95±0,04 ^{a C}	0,47±0,04 ^{c C}
	10	90,08±0,11 ^{a A}	-1,03±0,03 ^{a A}	1,95±0,06 ^{a C}	0,57±0,04 ^{b C}
	20	89,92±0,41 ^{a A}	-1,03±0,05 ^{a A}	1,99±0,08 ^{a C}	0,67±0,06 ^{a C}
	30	90,05±0,09 ^{a A}	-1,06±0,05 ^{a A}	2,01±0,06 ^{a C}	0,39±0,05 ^{c C}
100	0	85,78±0,16 ^{a B}	-6,86±0,06 ^{a C}	28,80±0,53 ^{a B}	2,10±0,09 ^{a B}
	10	85,57±0,86 ^{a B}	-6,99±0,12 ^{a, b C}	29,93±3,38 ^{a B}	1,72±0,23 ^{b B}
	20	85,37±0,15 ^{a B}	-6,93±0,06 ^{a, b C}	30,30±0,99 ^{a B}	1,91±0,11 ^{a, b B}
	30	85,46±0,74 ^{a B}	-7,08±0,05 ^{b C}	31,47±2,18 ^{a B}	1,21±0,11 ^{c B}
200	0	82,04±0,14 ^{b, a C}	-6,13±0,08 ^{a, b B}	43,49±0,41 ^{a A}	3,42±0,10 ^{a, b A}
	10	82,37±0,53 ^{a C}	-6,37±0,20 ^{b B}	43,65±1,64 ^{a A}	3,58±0,14 ^{a, b A}
	20	81,34±0,80 ^{a, b C}	-5,98±0,24 ^{a, b B}	45,95±1,84 ^{a A}	3,04±0,11 ^{b A}
	30	80,71±0,98 ^{b C}	-5,69±0,54 ^{a B}	46,97±2,66 ^{a A}	3,72±0,40 ^{a A}

C_{EEP} = g de extrato/100g de m_{G+CH} ; C_{CH} = g de colágeno hidrolisado/100g de m_{G+CH} ; m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada concentração de C_{EEP} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{CH} ; letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna para cada C_{CH} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{EEP} . Diferença entre médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Bodini (2011) avaliou filmes à base de gelatina incorporados com extrato etanólico de própolis, para uso como embalagem, e também observou redução da

luminosidade (L) e do croma a^* (de $-1 \pm 0,1$ para $-3,5 \pm 0,6$) e aumento no valor do croma b^* (de $2,6 \pm 0,1$ para $52,9 \pm 1,7$) devido ao aumento da concentração de extrato. Bodini (2011) também observou aumento da opacidade, provavelmente devido à coloração marrom escura do extrato etanólico de própolis.

4.2.2. Matéria total solúvel

Observou-se (Tabela 7) que o aumento da concentração de colágeno hidrolisado provocou aumento significativo da solubilidade dos filmes de desintegração oral. Os resultados podem estar relacionados à reduzida massa molecular do colágeno hidrolisado em relação à da gelatina. Segundo Gbogouri et al. (2004), quanto menor os peptídeos das proteínas espera-se que tenham proporcionalmente resíduos mais polares, com maior capacidade de formar pontes de hidrogênio com a água, o que consequentemente, provoca aumento da solubilidade.

Li et al. (2013) avaliaram a solubilidade de colágeno com diferentes graus de hidrólise e também observaram aumento da solubilidade devido a redução da massa molecular.

Os filmes incorporados com extrato etanólico de própolis apresentaram redução significativa da solubilidade quando comparados com os filmes sem extrato, que pode estar relacionado com a baixa solubilidade em água do extrato que foi adicionado. Segundo Silva et al. (2011), a própolis é composta por compostos hidrofílicos e hidrofóbicos, o que reduz a sua solubilidade em solventes tão polares como a água, sendo portanto mais solúvel em solventes de polaridade intermediária, como o álcool e éter.

Tabela 7 - Efeito da incorporação do colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na matéria total solúvel dos filmes de desintegração oral.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	Matéria total solúvel (%)
0	0	$37,8 \pm 1,7^{\text{d A}}$
	10	$41,1 \pm 2,9^{\text{c A}}$
	20	$49,4 \pm 1,0^{\text{b A}}$
	30	$53,6 \pm 2,4^{\text{a A}}$
100	0	$32,8 \pm 1,7^{\text{d B}}$
	10	$35,6 \pm 1,2^{\text{c B}}$
	20	$40,1 \pm 2,1^{\text{b B}}$
	30	$45,6 \pm 2,3^{\text{a B}}$
200	0	$33,0 \pm 2,2^{\text{d B}}$
	10	$36,9 \pm 2,3^{\text{c B}}$
	20	$40,8 \pm 2,1^{\text{b B}}$
	30	$46,9 \pm 2,3^{\text{a B}}$

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada concentração de C_{EEP} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{CH} ; letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna para cada C_{CH} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{EEP} . Diferença entre médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Hoque, Benjakul e Prodpran (2011) avaliaram a solubilidade de filmes à base de gelatina de peixe incorporados com diferentes extratos de vegetais (canela, cravo-da-índia, e estrela-de-asis) e verificaram redução significativa da solubilidade devido à incorporação dos extratos, que pode ter ocorrido devido à interação da proteína com os compostos fenólicos presentes nos extratos.

Bodini et al. (2013) observaram resultados semelhantes para filmes à base de gelatina incorporado com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis sendo encontrado para o filme com maior concentração de extrato (200g/100g de gelatina) solubilidade igual à $31,1 \pm 1,0 \%$.

4.2.3. Umidade e propriedades mecânicas

Em relação à umidade dos filmes (Tabela 8), após o acondicionamento, não foram observadas variações significativas em função da incorporação do colágeno hidrolisado ou do extrato etanólico de própolis.

Exemplos de curvas de tração versus elongação podem ser observados na Figura 11. Segundo Calister Júnior (2008), os materiais plásticos são caracterizados por apresentar deformação elástica, seguida por um escoamento, e deformação plástica para posteriormente serem rompidos. Sendo assim, todos os filmes, avaliados neste trabalho, apresentaram curvas típicas de materiais plásticos (Figura 11).

(a)

(b)

(c)

Figura 11 – Exemplos de curvas de tensão versus alongação dos filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}): (a) $C_{EEP} = 0\text{g}$ de extrato/100 g de m_{G+CH} , (b) $C_{EEP} = 100\text{g}$ de extrato/100 g de m_{G+CH} ; e (c) $C_{EEP} = 200\text{g}$ de extrato/100 g de m_{G+CH} . Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

Na Tabela 8 pode-se observar que o aumento da concentração de colágeno hidrolisado, independente da concentração de extrato etanólico de própolis, provocou redução na tensão de ruptura. O colágeno hidrolisado apresenta menor massa molecular quando comparado com a gelatina, desta forma o aumento da sua concentração pode ter provocado redução da coesividade da matriz polimérica. De maneira similar, Hoque, Benjakul e Prodpran (2011b) verificaram para filmes à base de gelatina com diferentes graus de hidrólise redução da tensão de ruptura devido à redução da massa molecular da gelatina, que pode ter provocado a redução da interação entre as cadeias de gelatina ou das zonas de junções reduzindo a resistência do material.

A incorporação de extrato etanólico de própolis (Tabela 8), por sua vez, promoveu aumento da resistência do material, que apresentou maior tensão na ruptura quando comparado com os filmes sem adição de extrato, no entanto não foram observadas variações significativas entre as duas concentrações de extrato, independente da concentração de colágeno hidrolisado. Segundo Hoque, Benjakul e Prodpran (2011a), que avaliaram a incorporação de extrato de canela, cravo e estrela de anis em filmes à base de gelatina, o aumento da resistência dos filmes devido à incorporação de extrato está relacionada com a interação dos compostos fenólicos presentes nos extratos com a matriz polimérica da gelatina.

O aumento da concentração de colágeno hidrolisado provocou aumento da elongação dos filmes, sendo observadas variações significativas entre os filmes sem CH e com adição de CH. O aumento da concentração de extrato etanólico de própolis provocou aumento da elongação dos filmes, no entanto não foi observada correlação devido ao aumento da concentração do EEP.

Tabela 8 - Efeito da incorporação de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na umidade, tensão na ruptura (TS) e alongação (E) dos filmes.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	Umidade (%)	TS (MPa)	E (%)
0	0	$12,9 \pm 0,8^{aA}$	$31,1 \pm 1,9^{aB}$	$35,8 \pm 2,8^{bB}$
	10	$12,6 \pm 0,7^{aA}$	$28,6 \pm 2,7^{bB}$	$39,6 \pm 3,5^{aA}$
	20	$13,1 \pm 0,7^{aA}$	$25,6 \pm 1,9^{cB}$	$40,4 \pm 3,5^{aA}$
	30	$13,1 \pm 1,1^{aA}$	$18,5 \pm 1,7^{dB}$	$41,1 \pm 2,9^{aB}$
100	0	$12,1 \pm 0,6^{aA}$	$34,8 \pm 2,0^{aA}$	$37,4 \pm 3,3^{aA,B}$
	10	$12,2 \pm 0,6^{aA}$	$32,3 \pm 2,8^{bA}$	$40,7 \pm 3,5^{bA}$
	20	$12,6 \pm 0,8^{aA}$	$27,7 \pm 1,8^{cA}$	$42,4 \pm 2,8^{bA}$
	30	$12,4 \pm 0,8^{aA}$	$25,9 \pm 1,9^{dA}$	$45,5 \pm 3,8^{cA}$
200	0	$12,9 \pm 0,6^{aA}$	$35,9 \pm 2,5^{aA}$	$40,2 \pm 3,4^{bA}$
	10	$12,0 \pm 0,8^{aA}$	$32,6 \pm 2,2^{bA}$	$41,4 \pm 3,5^{bA}$
	20	$12,1 \pm 0,9^{aA}$	$27,1 \pm 1,9^{cA}$	$42,9 \pm 3,9^{bA}$
	30	$12,6 \pm 0,8^{aA}$	$25,9 \pm 2,0^{cA}$	$45,9 \pm 4,1^{aA}$

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada concentração de C_{EEP} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{CH} ; letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna para cada C_{CH} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{EEP} . Diferença entre médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Uma grande variação nos valores de tensão na ruptura e alongação para propriedades mecânicas de filmes de desintegração oral é reportada na literatura. Estas propriedades estão diretamente relacionadas com a macromolécula utilizada para formação da matriz, assim como os outros componentes a ela incorporados (CALISTER JÚNIOR, 2008; DIXIT; PUTHLI, 2009).

Cilurzo et al. (2008) observaram, para filmes de desintegração oral à base de maltodextrina com diferentes concentrações de plastificante, valores entre $1,12 \pm 0,21$ e $7,72 \pm 0,07$ MPa para tensão na ruptura e entre $92,7 \pm 7,4$ e $559,7 \pm 31,4$ % para alongação. Tang et al. (2010) encontraram valores semelhantes de tensão na ruptura (entre $19,8 \pm 1,0$ e $23,3 \pm 0,5$ MPa) e valores superiores para alongação (entre $833,3 \pm 48,7\%$ e $566,7 \pm 34,3$ %) para filmes para liberação de medicamentos à base de acetato de vinila etileno.

4.2.4. Microscopia eletrônica de varredura

Para os filmes sem adição de extrato (Figuras 12a, 12b, 12c e 12d) observou-se, de maneira geral, uma estrutura compacta, similar ao largamente relatado na literatura para filmes à base de gelatina apenas (ANDERUCCETTI et al., 2011; ABRUZZO et al., 2012; BODINI et al., 2013).

Por outro lado, para os filmes com adição de extrato (Figuras 12e, 12f, 12g, 12h, 12i, 12j, 12k e 12l), independente da concentração de extrato adicionada, verificou-se uma matriz menos compacta e mais desordenada, possivelmente devido ao processo de alta agitação utilizado para incorporação do extrato etanólico de própolis na matriz polimérica, bem como a associação do extrato à matriz. De maneira geral, não foram observadas grandes variações na estrutura interna, dos filmes aditivados, em função da incorporação do colágeno hidrolisado (Figura 12).

Figura 12 – Efeito da incorporação de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na microestrutura de fratura dos filmes de desintegração oral à base de gelatina: (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (e) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (f) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (g) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (h) $C_{CH} = 30$ g/100g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} ; (i) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (j) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (k) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} ; (l) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} . Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram reportados para análise de microestrutura devido à adição de extrato em filmes. Rattaya, Benjakul e Prodpran (2009) avaliaram a incorporação de extrato de algas marinhas em filmes à base de gelatina e verificaram, para os filmes aditivados, uma estrutura interna mais rugosa e com zonas de descontinuidade em relação aos filmes sem adição do extrato, possivelmente associado à ligação dos compostos fenólicos do extrato com a matriz.

Bodini et al. (2013) avaliaram a incorporação de extrato etanólico de própolis em filmes à base de gelatina para uso como embalagem e verificaram que o aumento da concentração do extrato acarretou em aumento da porosidade da matriz, enquanto que o filme sem adição de extrato formou uma matriz mais compacta e orientada.

4.2.5. Mucoadesividade *in vitro*

Observou-se, em relação à incorporação de colágeno hidrolisado, que a maior concentração deste provocou aumento significativo da mucoadesividade dos filmes (Tabela 9), que pode estar relacionado com a reduzida massa molecular do CH, que apresenta moléculas mais polares com maior capacidade de formação de ligações de hidrogênio, que aumenta a interação dos filmes com a mucosa.

Em relação ao efeito da concentração de extrato etanólico de própolis verificou-se aumento significativo da mucoadesividade devido ao aumento da concentração de EEP. O processo de mucoadesão é resultado das interações eletrostática, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre o material e a mucosa (BANG et al., 2011) desta forma, o aumento da mucoadesividade devido à incorporação de EEP pode estar relacionado com o aumento dos grupos funcionais com capacidade de interação com a mucosa por ligações hidrofóbicas.

Tabela 9 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) na mucoadesividade dos filmes de desintegração oral à base de gelatina.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	Mucoadesividade (N)
0	0	$0,52 \pm 0,06$ ^{b C}
	10	$0,55 \pm 0,05$ ^{a,b B}
	20	$0,55 \pm 0,07$ ^{a,b C}
	30	$0,59 \pm 0,08$ ^{a C}
100	0	$0,73 \pm 0,08$ ^{b B}
	10	$0,75 \pm 0,08$ ^{b A}
	20	$0,78 \pm 0,08$ ^{a,b B}
	30	$0,83 \pm 0,09$ ^{a B}
200	0	$0,81 \pm 0,10$ ^{b A}
	10	$0,82 \pm 0,10$ ^{a,b A}
	20	$0,89 \pm 0,11$ ^{a,b A}
	30	$0,91 \pm 0,06$ ^{a A}

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada concentração de C_{EEP} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{CH} ; letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna para cada C_{CH} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{EEP} . Diferença entre médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Peh e Wong (1999) avaliaram filmes de carboximetilcelulose de sódio e hidroxipropilmetilcelulose como veículo para produtos fármacos e encontraram força mucoadesiva de $4,43 \pm 0,72$ N para os filmes de carboximetilcelulose de sódio e de $2,77 \pm 0,56$ N para os filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose.

Mohamed, Haider e Mohamed Ali (2011) encontraram valores entre $0,080 \pm 0,019$ N e $0,698 \pm 0,064$ N para filmes mucoadesivos de carboximetilcelulose e hidroxipropilcelulose, respectivamente, aditivados com cloridrato de diltiazem.

Takeuchi et al. (2008) avaliaram filmes à base de hidroxipropilcelulose e carboxivinil e observaram valores entre 1 N e 1,5 N (0,1 e 0,15 kfg) para os filmes controle e com incorporação de polietilenoglicol (0,3%). Mura et al. (2010) avaliaram filmes à base de quitosana e plastificados com glicerol e verificaram força mucoadesiva entre 0,33 N e 0,41 N para filmes com 2,5, e 1% de KollicoatIR[®], respectivamente.

Verma e Chattopadhyay (2012) avaliaram filmes mucoadesivos e verificaram valores iguais à 0,87 N e 5,15 N para filmes de carboximetilcelulose e quitosana, respectivamente.

Abruzzo et al. (2012) observaram, para filmes a base de gelatina incorporados com cloridrato de propranolol, valor igual a 0,103 mN (10,3 dyne) para mucoadesividade, sendo este valor bem inferior ao encontrado neste trabalho.

4.2.6. Ângulo de contato

Observou-se na Tabela 10 o efeito da concentração de colágeno hidrolisado e extrato etanólico de própolis no ângulo de contato dos filmes de desintegração oral.

Tabela 10 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) no valor do ângulo de contato entre a gota de água e o filme de desintegração oral.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	AC (°)
0	0	$84,0 \pm 3,8$ ^{a A}
	10	$82,3 \pm 4,9$ ^{a,b A}
	20	$80,6 \pm 5,7$ ^{a,b A}
	30	$79,1 \pm 5,4$ ^{b A}
	0	$85,1 \pm 4,7$ ^{a A}
100	10	$83,1 \pm 4,7$ ^{a,b A}
	20	$82,0 \pm 5,0$ ^{a,b A}
	30	$81,6 \pm 5,8$ ^{b A}
	0	$86,1 \pm 2,9$ ^{a A}
200	10	$84,8 \pm 4,0$ ^{a A}
	20	$83,3 \pm 6,0$ ^{a A}
	30	$82,8 \pm 5,8$ ^{a A}

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado. Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada concentração de C_{EEP} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{CH} ; letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna para cada C_{CH} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{EEP} . Diferença entre médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS.

Pode-se observar (Tabela 10), em relação à concentração de colágeno hidrolisado, redução do ângulo de contato para os filmes com maior concentração de CH para os filmes com 0 e 100 g de EEP/100g de m_{G+CH} . No entanto para a

concentração de 200g de EEP/100g de m_{G+CH} não foram observados diferenças significativas devido ao aumento da concentração de colágeno, possivelmente devido a alta concentração de extrato.

Segundo Florence e Attwood (2003) a redução do valor do ângulo de contato indica uma maior molhabilidade da superfície. Assim, o aumento da molhabilidade dos filmes pode estar relacionado com o aumento da concentração de grupos mais polares provenientes do colágeno hidrolisado.

Em relação ao aumento da concentração de extrato etanólico de própolis não foram verificadas diferenças significativas na faixa de concentração analisada, apesar do caráter hidrofóbico do extrato.

Segundo Karbowiak, Debeaufort e Voilley (2006) valores maiores que 65° para ângulo de contato indicam superfícies com caráter hidrofóbico. Desta maneira, os filmes analisados neste trabalho apresentam superfícies com características hidrofóbicas.

Resultados semelhantes aos observados neste trabalho para ângulo de contato foram encontrados por Otto et al. (2008), que encontraram ângulos de contato ao redor de 80° para filmes a base de poli(estireno-co-metacrilato de metila) e poli(estireno-com-metacrilado de etila), e os autores ainda sugerem que este valor de ângulo de contato indica um filme com característica hidrofóbica.

Guerrero et al. (2011) observaram, para filmes à base de proteína de soja incorporados com diferentes concentração de gelatina (de 0 à 15 %), aumento do ângulo de contato com o aumento da concentração de gelatina (de 25° para 45°). Os autores sugerem que o aumento do ângulo se deve ao aumento da hidrofobicidade da superfície, possivelmente devido ao aumento de grupos hidrofóbicos gerados pela interação entre a gelatina e a proteína de soja.

4.2.7. Tempo de desintegração

Verificou-se (Tabela 11) que a adição de colágeno hidrolisado reduziu significativamente o tempo de desintegração dos filmes. Os resultados podem estar relacionados com a reduzida massa molecular do colágeno hidrolisado, que, conseqüentemente, apresenta maior interação com a água.

Já em relação ao aumento da concentração de extrato etanólico de própolis (Tabela 11) foi observado aumento do tempo de desintegração dos filmes. Os compostos fenólicos presentes em extrato naturais podem interagir com a matriz de gelatina, causando a redução da solubilidade dos filmes (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011a), desta forma os compostos fenólicos presentes no EEP podem ter interagido com a matriz de gelatina, provocando redução da solubilidade e, conseqüentemente, aumentando no tempo de desintegração.

Tabela 11 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) no tempo de dissolução dos filmes de desintegração oral.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	Tempo de desintegração (min)
0	0	$7,7 \pm 0,7$ ^{a A}
	10	$6,2 \pm 0,5$ ^{b A}
	20	$5,4 \pm 0,8$ ^{c A}
	30	$4,3 \pm 0,5$ ^{d A}
100	0	$9,7 \pm 1,2$ ^{a B}
	10	$7,9 \pm 1,2$ ^{b B}
	20	$7,6 \pm 0,9$ ^{c B}
	30	$5,9 \pm 0,5$ ^{c B}
200	0	$12,4 \pm 1,1$ ^{a C}
	10	$10,4 \pm 1,4$ ^{b C}
	20	$8,8 \pm 1,0$ ^{c C}
	30	$6,7 \pm 0,5$ ^{d C}

Letras minúsculas diferentes, na mesma coluna para cada concentração de C_{EEP} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{CH} ; letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna para cada C_{CH} , indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes C_{EEP} . Diferença entre médias obtidas através do teste Duncan, utilizando-se o programa computacional SAS. Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram reportados por Abruzzo et al. (2012) que verificaram para filmes de desintegração à base de gelatina e incorporados com cloridrato de propranolol completa desintegração em 10 minutos.

Segundo Dixit e Puthli (2009) os filmes de rápida desintegração são caracterizados por se desintegrarem em aproximadamente 30 segundos. Desta forma os filmes estudados neste trabalho apresentam tempos mais elevados, não podendo ser classificados como filmes de rápida desintegração.

4.2.8. Grau de intumescimento

Devido à solubilidade e desintegração das amostras, durante a análise, não foram possíveis à obtenção dos dados de grau de intumescimento para todos os tempos para todas as formulações.

Observou-se, em relação à incorporação de colágeno hidrolisado, variações no grau de intumescimento para alguns tempos, no entanto não houve correlação com o aumento da concentração de CH.

Em relação à incorporação de extrato etanólico de própolis (Figura 13) observou-se que o aumento na concentração de EEP, reduziu significativamente a capacidade de intumescimento dos filmes para a maioria dos tempos de análise. Possivelmente, com a adição do extrato ao filme ocorreu a ligação dos compostos fenólicos com a matriz de gelatina, dificultado a entrada de água na matriz polimérica (HOQUE; BENJAKUL; PRODPRAN, 2011a).

Figura 13 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) no grau de intumescimento (GI) em relação ao tempo dos filmes com diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}), sendo: (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; e (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} . Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado. Letras diferentes, na horizontal, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias de concentração nos diferentes períodos de armazenamento.

Mu et al. (2012) estudaram filmes de gelatina plastificados com glicerol encontraram valores semelhantes aos deste trabalho (entre 312,0 e 613,4 %).

Abruzzo et al. (2012) avaliaram filmes com diferentes proporções de quitosana e gelatina e verificaram que o aumento da concentração de gelatina provocou aumento da capacidade de intumescimento de $190,0 \pm 7,9$ (0 % de gelatina) para $352,7 \pm 8,7$ (80 % de gelatina).

A gelatina pode induzir inchaço considerável em filmes devido a sua solubilidade e estrutura formada por sua matriz polimérica (GORDON et al., 2010).

Segundo Abruzzo et al. (2012) o alto grau de intumescimento obtido para os filmes com gelatina se deve ao grande número de aminoácidos ionizados na estrutura e, conseqüentemente, a presença de cargas livres que favorecem a entrada de água na matriz polimérica.

4.2.9. Concentração de compostos fenólicos totais dos filmes

O aumento da concentração de extrato etanólico de própolis (Tabela 12), como era esperado, aumentou a concentração dos compostos fenólicos presentes nos filmes. Além disso, a presença dos compostos fenólicos nos filmes indicou que o processo de produção dos filmes não provocou degradação dos compostos fenólicos.

Tabela 12 - Efeito da concentração de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) na concentração de compostos fenólicos ($C_{Fenólicos}$) nos filmes de desintegração oral.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	$C_{Fenólicos}$ (mg de ácido gálico/ g de filme seco)
100	0	$35,4 \pm 1,8^b$
	10	$34,8 \pm 2,2^b$
	20	$36,3 \pm 2,1^b$
	30	$35,8 \pm 1,9^b$
	0	$69,6 \pm 2,6^a$
200	10	$70,1 \pm 2,2^a$
	20	$71,1 \pm 2,5^a$
	30	$70,4 \pm 2,3^a$

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina mais colágeno hidrolisado. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as médias, obtidas pelo teste de Duncan, utilizando o programa computacional SAS 9.2.

Semelhante ao encontrado neste trabalho Juliano, Pala e Cossu (2007) avaliaram a incorporação de extrato etanólico de própolis em filmes de desintegração oral à base de diferentes macromoléculas (alginato, Agar e blenda de quitosana-alginato) e

encontraram compostos fenólicos nos filmes aditivados indicando que o processo de produção do filme não degradou estes compostos.

4.2.10. Liberação *in vitro*

Em relação à liberação dos compostos bioativos *in vitro* verificou-se que todos os filmes apresentaram liberação máxima dos compostos fenólicos após 15 minutos (Figura 14).

A incorporação do colágeno hidrolisado favoreceu a liberação mais rápida dos compostos fenólicos nas duas concentrações de extrato (Figura 14). Observou-se que os filmes com maior concentração de colágeno hidrolisado apresentaram maior solubilidade (Tabela 7) e menor tempo de desintegração (Tabela 11), o que pode ter favorecido a liberação mais rápida dos compostos fenólicos.

Em relação à incorporação de extrato etanólico de própolis pode ser observado que os filmes com maior concentração de EEP apresentaram uma liberação mais lenta até o tempo de 6 minutos (Figura 14), possivelmente devido ao maior tempo de desintegração dos filmes com maior concentração de EEP.

(a)

(b)

Figura 14 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) na liberação *in vitro* de filmes de desintegração com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}), sendo: (a) $C_{EEP} = 100\text{g}$ de extrato etanólico de própolis/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{EEP} = 200\text{g}$ de extrato etanólico de própolis/100 g de m_{G+CH} . Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

Juliano, Pala e Cossu (2007) verificaram, para filmes à base de alginato e blendas de alginato-quitosa aditivados com extrato de própolis, liberação máxima de compostos fenólicos em aproximadamente 2 horas.

Abruzzo et al. (2012) avaliaram a liberação de cloridrato de propranolol em filmes com à base de gelatina e quitosana (em diferentes proporções) e observaram que apenas o filmes à base de gelatina apresentou liberação completa da droga após 30 minutos, e adicionalmente, foi o único filmes que apresentou desintegração completa neste intervalo de tempo.

O perfil de liberação observado para os filmes deste trabalho aliados à alta mucoadesividade e elevado tempo de desintegração, quando comparado com os filmes de rápida desintegração oral, mostram que estes filmes podem ser interessantes para aplicação como um sistema de liberação controlada.

4.2.11. Cinética de liberação

Os parâmetros da equação encontrados para a cinética de liberação podem ser observados na Tabela 13. De um modo geral, independente da formulação, verificou-se que os dados de liberação se ajustaram ao modelo de Korsmeyer-Peppas em função dos valores elevados de R^2 .

A constante k é uma constante de cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo de liberação (KORSMEYER; PEPPAS, 1981).

Os filmes com maior concentração de colágeno, nas duas concentrações de extrato, apresentaram maior valor de k (Tabela 13), indicando uma liberação mais rápida do composto ativo. Isto pode ter ocorrido devido à redução do tempo de desintegração dos filmes com o aumento da concentração de CH, que pode ter facilitado a liberação dos compostos fenólicos.

Em relação ao aumento da concentração de extrato etanólico de própolis, verificou-se valores de k inferiores para a maior concentração de EEP (Tabela 13),

indicando uma liberação mais lenta, possivelmente devido ao maior tempo de desintegração dos filmes (Tabela 11).

Os valores de n estão relacionados com o mecanismo de liberação do composto ativo, sendo que: quando n igual à 0,5 representa um transporte por difusão Fickiana, valores entre 0,5 e 0,89 representam transporte anômalo; entre 0,89 e 1,0 representam transporte de Caso II; e superiores à 1,0 representam transporte de Super-caso II (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Desta forma, as formulações com 0 e 10 g de colágeno hidrolisado (g/ 100g de m_{G+CH}), ambas com 100g de extrato etanólico de própolis (g/100g de m_{G+CH}) apresentaram mecanismo de liberação por transporte anômalo, isto é, a liberação ocorreu devido ao processo conjunto de difusão (Fickiana) e relaxação do polímero. Todas as outras formulação apresentam mecanismos de liberação do tipo Caso II ou Super-caso II, cuja liberação ocorre devido à relaxação, erosão e dissolução da matriz.

Tabela 13 - Efeito da incorporação do colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos parâmetros de cinética de liberação dos filmes de desintegração oral.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	k	N	R ²
100	0	0,1133	0,7620	0,9167
	10	0,1166	0,8856	0,9424
	20	0,1037	1,1788	0,9746
	30	0,1415	1,0195	0,9860
200	0	0,0746	0,9183	0,9314
	10	0,0695	1,1074	0,9708
	20	0,0777	1,0531	0,9720
	30	0,0859	1,0140	0,9444

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

Koland, Charyulu e Prabhu (2010) estudaram diferentes modelos para analisar a cinética de liberação para seus filmes orais mucoadesivos à base de carbopol 934P e

poli(vinil álcool), sendo o modelo de Korsmeyer-Peppas o mais adequado para a maioria das formulações estudadas, observando valores de n mais próximos de 0,5 (difusão Fickiana).

Mohamed, Haider e Mohamed Ali (2011) avaliando a cinética de liberação pelas equações de Korsmeyer-Peppas em filmes orais mucoadesivos à base de diferentes polímeros (alginato de sódio, Eudragit®, hidroxipropilcelulose, poli(vinil álcool), carboximetilcelulose e hidroxipropilcelulose) encontraram para a maioria das formulações valores de n próximos de 0,5; indicando transferência principalmente por difusão Fickiana, e baixos valores para a constante k , indicando filmes com liberação mais lenta (tempo mínimo de 53,48 minutos para liberação de 50% do fármaco) quando comparados com este trabalho.

4.2.12. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Exemplos dos termogramas obtidos nas análises calorimétrica para filmes de desintegração oral podem ser observados na Figura 15. Os resultados de temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH) podem ser observados na Tabela 14. Não foram observadas variações significativas na T_m , tanto devido à incorporação de colágeno hidrolisado, quanto para adição de extrato. Em relação à entalpia de fusão não foi observada diferença significativa devido à variação de colágeno hidrolisado, no entanto foi observado redução da entalpia devido ao aumento da concentração de própolis. Esta redução da entalpia devido à incorporação de EEP pode estar relacionada com a interação dos compostos fenólicos presentes no extrato com a matriz de gelatina.

Figura 15 – Exemplos de termogramas obtidos na análise calorimétrica dos filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e 30 g de colágeno hidrolisado/100 g de m_{G+CH} . Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

Tabela 14 - Efeito da concentração de colágeno hidrolisado (C_{CH}) e extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos parâmetros calorimétricos: temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m) e entalpia de fusão (ΔH).

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	T_m (°C)	ΔH (J/g)
0	0	89,2±0,1 ^{a A}	19,7±0,8 ^{a A}
	10	89,0±1,6 ^{a A}	18,7±1,2 ^{a A}
	20	89,5±0,2 ^{a A}	16,6±2,3 ^{a A}
	30	88,7±0,8 ^{a A}	16,2±0,6 ^{a A}
100	0	89,8±3,5 ^{a A}	11,8±2,0 ^{a B}
	10	90,2±1,9 ^{a A}	12,1±0,9 ^{a B}
	20	88,4±3,6 ^{a A}	11,3±1,4 ^{a B}
	30	90,2±1,7 ^{a A}	11,7±0,9 ^{a B}
200	0	89,2±1,6 ^{a A}	8,4±1,0 ^{a C}
	10	88,6±3,4 ^{a A}	7,8±0,9 ^{a C}
	20	89,4±0,9 ^{a A}	8,4±0,7 ^{a C}
	30	88,0±0,5 ^{a A}	7,3±0,7 ^{a C}

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado Médias seguidas de mesma letra na vertical não diferem estatisticamente para o nível de 5% de significância pelo teste de Duncan.

Resultados semelhantes foram observados por Rattaya, Benjakul e Prodpran (2009) para filmes à base de gelatina incorporados com extrato de algas, que observaram redução da entalpia, possivelmente devido à baixa entalpia necessário para quebrar as ligações formadas entre os compostos presentes no extrato e gelatina.

Peña et al. (2010) que avaliaram a incorporação de tanino (composto fenólico) em matriz de gelatina e verificou redução na entalpia de fusão (ΔH), sendo que este comportamento pode ter ocorrido devido a uma provável perturbação das ligações de hidrogênio entre as cadeias de gelatina, alterando a formação da estrutura helicoidal característica da gelatina, com formação de novas interações de hidrogênio entre os grupos hidroxilo da molécula de tanino e dos grupos polares da gelatina e interações hidrofóbicas.

4.2.13. Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Na Figura 16 pode-se observar que os filmes, independente da formulação, apresentaram bandas típicas às observadas para gelatina reportadas na literatura. Foram observadas bandas próximas à 1631 cm^{-1} relacionada às vibrações da amida I (estiramento do $\text{C}=\text{O}$) (SIONKOWSKA et al., 2004; YAKIMETS et al., 2005). As bandas observadas para os filmes na região de 1535 cm^{-1} referem-se às bandas típicas da amida II, relacionadas ao estiramento do grupo $\text{C}-\text{N}$ e deformação angular do grupo $\text{N}-\text{H}$ de peptídeos (SIONKOWSKA et al., 2004). De maneira similar foram observadas bandas na região de 1240 cm^{-1} relacionadas com a vibração da amida III; e ao redor de 3300 cm^{-1} relacionadas à amida A (estiramento do grupo $\text{N}-\text{H}$) (YAKIMETS et al., 2005).

Como pode ser observado na Figura 18 os filmes não apresentaram variação de bandas devido à incorporação de colágeno hidrolisado. Em relação ao aumento da concentração do extrato etanólico de própolis pode ser observado deslocamento da amida A de 3280 cm^{-1} do filme controle para 3285 cm^{-1} dos filmes aditivados. A amida I deslocou de 1630 cm^{-1} para 1634 cm^{-1} e a amida III de 1235 cm^{-1} para 1238 cm^{-1} , para os filmes controle e aditivado, respectivamente. Os compostos fenólicos podem

interagiram com a matriz polimérica de proteína (OZDAL; CAPANOGLU; ALTAY, 2013), isto pode estar relacionado com o deslocamento de algumas bandas de vibração devido à incorporação do extrato etanólico de própolis.

Resultados semelhantes ao deste trabalho foram reportados na literatura sobre o deslocamento de bandas devido à incorporação de compostos fenólicos em matriz de gelatina.

Aewsiri et al. (2009) verificaram que a incorporação de compostos fenólicos oxidados (taninos) em gelatina, provocou deslocamento das bandas referentes à amidas I (de 1637 para 1635 cm^{-1}), II (de 1541 para 1535 cm^{-1}) e III (de 1238 para 1236 cm^{-1}), em função da redução da ordenação molecular.

Hoque, Benjakul e Prodpran (2011a) que verificaram deslocamento da amida A (de 3275 para 3277 cm^{-1}) devido à incorporação de extrato de anis em filmes à base de gelatina, correlacionando este deslocamento com a interação dos compostos fenólicos presentes no extrato com a matriz polimérica. Segundo os autores este deslocamento ocorreu devido à ligação dos compostos fenólicos com os grupos NH_2 da gelatina.

Yan et al. (2011) avaliaram a adição de ácido gálico e rutina em filmes à base de gelatina e observaram deslocamento da amida III de 1243 cm^{-1} para 1238 e 1239 cm^{-1} devido a adição de ácido gálico e rutina, respectivamente. Os autores sugerem que este deslocamento se deve a interação dos compostos fenólicos com o grupo C-N-C das moléculas de gelatina.

Wu et al. (2013) observaram, para filmes à base de gelatina adicionados de extrato de chá verde, deslocamento da amida A (de 3317 para 3302 cm^{-1}), relacionado a ligação do grupo OH do extrato com os grupos N-H da gelatina através de ligações de hidrogênio.

Figura 16 - Espectros de absorção de infravermelho para filmes de desintegração oral com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}): (a) $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (b) $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (c) $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (d) $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} . Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado.

4.2.14. Atividade antimicrobiana

Na Figura 17 pode-se observar exemplos de placas utilizadas para a avaliação da atividade antimicrobiana dos filmes de desintegração oral.

Figura 17 - Atividade antimicrobiana dos filmes de desintegração oral com: (A) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (B) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (C) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (D) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} ; (E) $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} ; (F) $C_{EEP} = 100$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (G) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (H) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} ; (I) $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 0$ g/100g de m_{G+CH} ; (J) $C_{EEP} = 200$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 10$ g/100 g de m_{G+CH} ; (K) $C_{EEP} = 0$ g/100g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 20$ g/100 g de m_{G+CH} ; (L) $C_{EEP} = 0$ g/100 g de m_{G+CH} e $C_{CH} = 30$ g/100 g de m_{G+CH} .

Verificou-se que a incorporação de colágeno não afetou a atividade antimicrobiana dos filmes (Figura 17 e Tabela 15), o que era esperado, pois o colágeno não apresenta atividade antimicrobiana.

Em relação à incorporação de extrato etanólico de própolis, pode ser observado que os filmes sem adição de extrato não apresentaram atividade antimicrobiana (Figura 17a, 20b, 20c e 20d), em função do crescimento de colônias de *S. aureus* sobre os filmes. Nos filmes, incorporados com extrato, foram observados halo de inibição contra a bactéria, porém não foi observada diferença significativa em função do aumento da concentração de extrato etanólico de própolis (Tabela 15).

Tabela 15 - Efeito da concentração do colágeno hidrolisado (C_{CH}) e da concentração extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) nos filmes de desintegração oral na atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

C_{EEP} (g/100g de m_{G+CH})	C_{CH} (g/100g de m_{G+CH})	Diâmetro de inibição (mm)
0	0	ND
	10	ND
	20	ND
	30	ND
100	0	$27,4 \pm 0,5^a$
	10	$27,4 \pm 0,5^a$
	20	$27,2 \pm 0,8^a$
	30	$27,2 \pm 0,7^a$
200	0	$28,1 \pm 0,6^a$
	10	$28,5 \pm 0,5^a$
	20	$28,5 \pm 0,5^a$
	30	$28,8 \pm 0,7^a$

Nota: m_{G+CH} = massa de gelatina + colágeno hidrolisado; ND = não detectado. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente para o nível de 5% de significância pelo teste de Duncan.

Dentre os compostos ativos presentes na própolis que são responsáveis por sua atividade antimicrobiana pode-se destacar os compostos fenólicos (MOHAMMADZADEH et al., 2007). Desta forma, os resultados encontrados para atividade antimicrobiana enfatizam a estabilidade dos compostos ativos da própolis após o processamento dos filmes de desintegração oral, conforme apresentado na avaliação da concentração de compostos fenólicos dos filmes.

Juliano, Pala e Cossu (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana contra *S. aureus* de filmes de orais à base de alginato, ágar e alginato/quitosana com adição de própolis para problemas bucais encontrado halo de inibição igual à 12,65mm para filmes com tamanho inicial igual à 6,5 mm, entretanto, os pesquisadores verificaram intumescimento dos filmes ao final da análise de 6,5 para 8,4mm, o que pode ter provocado elevados valores do halo de inibição deste filmes.

Victorino et al. (2009) avaliaram a incorporação de extrato de própolis em pasta para tratamento endodôntico e a mesma apresentou alta atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e outros microrganismos bucais.

Resultados semelhantes foram reportados Bodini et al. (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana de filmes à base de gelatina incorporados com extrato etanólico de própolis contra *S. aureus* e observaram, aproximadamente, 27 mm de diâmetro de inibição, semelhante aos resultados observados neste trabalho.

4.2.15. Análise de estabilidade dos filmes

A estabilidade dos filmes foi avaliada em função da concentração de compostos fenólicos presentes no filme durante o período de armazenamento (12 semanas) na presença de luz. Na Figura 18 podemos observar que todas as formulações apresentaram boa estabilidade dos compostos fenólicos no período avaliado.

Figura 18 - Efeito do tempo de armazenamento (semanas) na concentração de compostos fenólicos dos filmes de desintegração oral à base de gelatina com diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (C_{EEP}) e diferentes concentrações de colágeno hidrolisado (C_{CH}): (a) $C_{\text{CH}} = 0 \text{ g} / 100 \text{ g de } m_{\text{G+CH}}$; (b) $C_{\text{CH}} = 10 \text{ g} / 100 \text{ g de } m_{\text{G+CH}}$; (c) $C_{\text{CH}} = 20 \text{ g} / 100 \text{ g de } m_{\text{G+CH}}$; (d) $C_{\text{CH}} = 30 \text{ g} / 100 \text{ g de } m_{\text{G+CH}}$. Nota: $m_{\text{G+CH}}$ = massa se gelatina + colágeno hidrolisado. Letras diferentes, na horizontal, indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias de concentração nos diferentes períodos de armazenamento.

Daud, Sapkal e Bonde (2011) também observaram estabilidade de filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose incorporados com extrato de gengibre armazenados ($40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C} / 75 \% \text{ UR}$; $30 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C} / 75 \% \text{ UR}$).

Bodini et al. (2013) observaram que os filmes à base de gelatina, incorporados com extrato etanólico de própolis, apresentaram boa estabilidade, mostrando que a matriz polimérica de gelatina foi capaz de preservar os compostos fenólicos durante o período de estocagem (177 dias).

5. CONCLUSÕES

A incorporação do colágeno hidrolisado, devido à sua reduzida massa molecular provocou variações nas propriedades dos filmes, aumentando a solubilidade e reduzindo o tempo de desintegração provocando uma liberação mais rápida dos compostos fenólicos. O aumento da concentração de colágeno hidrolisado também provocou aumento da mucoadesividade, o que é desejável para filmes de desintegração oral, pois aumenta a permanência do filme na boca, aumentando possivelmente a ação e liberação dos compostos fenólicos.

A incorporação do extrato etanólico de própolis também provocou alterações nas propriedades dos filmes, como aumento a solubilidade, e, conseqüentemente, aumento do tempo de desintegração. Além disso, os filmes aditivados foram mais resistentes e apresentaram maior mucoadesividade. A quantificação de compostos fenólicos dos filmes mostrou que o processo de produção do filme não degradou estes compostos e os filmes de desintegração aditivados apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, os filmes com extrato etanólico de própolis mantiveram a concentração constante de compostos fenólicos após 84 dias de armazenamento.

Em função dos resultados observados, os filmes de desintegração oral à base de gelatina incorporados com colágeno hidrolisado e extrato etanólico de própolis representam uma alternativa promissora como veículo para a liberação de compostos fenólicos na cavidade oral. Para trabalhos futuros seria interessante a avaliação de testes clínicos para comprovar a eficiência dos filmes na mucosa bucal, assim como a avaliação da aceitação destes filmes pelos consumidores, sendo talvez necessária a incorporação de agentes edulcorantes e flavorizantes para aumentar a aceitação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.; SALEM, S. A. M.; SALLAM, A. Mucoadhesive dosage form of lidocaine hydrochloride: mucoadhesive and physicochemical characterization. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 33, p. 855-864, 2007.

AEWSIRI, T. et al. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin modified by oxidized phenolic compounds. **Food Chemistry**, London, v. 117, n. 1, p. 160-168, 2009.

AGA, H. et al. Isolation and identification of antimicrobial compounds in Brazilian propolis. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Japan, v. 58, p. 945-946, 1994.

AHN, M-R. et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 4, p. 1383-1392, 2007.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Easton, v.40, p.4168-4170. 2001.

ALMEIDA, N. M. G.; LOPES, T. J.; CHAUD, M. V. Desenvolvimento de uma formulação de cloridrato de metoclopramida sob a forma de filme hidrogelatinoso. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 1, p. 114-119, 2012.

ALMEIDA, R. V. D. et al. Efeito clínico de solução anti-séptica à base de própolis em crianças cárie ativas. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, João Pessoa, PR, v. 6, n. 001, p. 87-92, 2006.

ANDERS, R.; MERKLE, H. P. Evaluation of laminated muco-adhesive patches for buccal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 49, p. 231-240, 1989.

ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. **American Journal of Infect Control**, St. Louis, USA, v. 29, n. 4, p. 256-25, 2001

ANDREUCCETTI, C. et al. Effect of surfactants on the functional properties of gelatin-based edible film. **Journal of Food Engineering**, London, v. 103, n. 2, p. 129-136, 2011.

ASTM. **ASTM D 882 – 10**: Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting, Filadélfia, PA: American Society for Testing and Materials. 2010.

AUTIO-GOLD, J. The role of clorhexidine in caries prevention. **Operative Dentistry**, Seattle, USA,, v. 33, p. 710-716, 2008

AVACHAT, A. M.; GUJAR, K. N.; WAGH, K. V. Development and evaluation of tamarind seed xyloglucan-based mucoadhesive buccal films of rizatriptan benzoate. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 91, p. 537-542, 2013.

BENKOVIC, V. et al. Enhanced antitumor activity of irinotecan combined with propolis and its polyphenolic compounds on Ehrlich ascites tumor in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v. 61, p. 292-297, 2007.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Introdução à química de alimentos. 3rd ed. São Paulo: Livraria Varela, 2003.

BODDUPALLI, B. M. et al. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, Gwalior, v. 1, n. 4, p. 381-387, 2010.

BODINI, R. B. **Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis**. 2011. 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2011.

BODINI, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **Food science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 104-110, 2013.

BONITO, A. J.; LUZ, L.; LOHR, K. N. Impact of local adjuncts to scaling and root planing in periodontal disease therapy: a systematic review. **Journal of Periodontology**, Indianapolis, v. 76, p. 1227-1236, 2005.

BOYANOVA, L. et al. In vitro activity of Bulgarian propolis against 94 clinical isolates of anaerobic bacteria. **Anaerobe**, London, v. 12, n. 4, p. 173-177, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Aprovar regulamentos técnicos de identidade e qualidade de apitoxina, cera de abelha, geleia real, geleia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de Janeiro de 2001, Seção 1, p. 46.

BRUSCHI, M. L.; JONES, D. S.; PANZERI, H.; GREMIÃO, M. P. D.; FREITAS, O.; LARA, E. H. G. Semisolid sytems containing própolis for the treatment of periodontal disease: *in vitro* release kinetics, syringeability, rheological, textural, and mucoadhesive properties. **Journal of pharmaceutical sciences**, Washington, vol. 96, p. 2074-2089, 2007.

CALISTER JÚNIOR, W. D. Ciências e engenharia de materiais: uma introdução. Tradução: Sérgio Murilo Stamile Soares, 7ª ed, 705 p. Rio de Janeiro, LTC, 2008.

CAMPISI, G. et al. Human buccal mucosa as an innovative site of drug delivery. **Current Pharmaceutical Desing**, Barking, v. 16, p. 641-652, 2010.

CARVALHO, A. A. et al. *In vivo* antitumoural activity and composition of na oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 1239-1245, 2011.

CARVALHO, R. A.; GROSSO, C. R. F. Characterization of gelatin based films modified with transglutaminase glyoxal and formaldehyde. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 717-726, 2004.

CESCHEL, G. C. et al. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenetyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, p. 44-52, 2002.

CHANG, H. L. et al. Protoapigenone, a novel flavonoid, inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, Virginia, v. 267, n. 1, p. 85-95, 2008.

CHANSANROJ, K.; BETZ, G. Sucrose esters with various hydrophilic-lipophilic properties: Novel controlled release agents for oral drug delivery matrix tablets prepared by direct compaction. **Acta Biomaterialia**, Oxford, v. 6, n. 8, p. 3101-3109, 2010.

CHOUDHARI, M. K. et al. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of Western Maharashtra, India. **Journal of Enthnopharmacology**, Lausanne, v. 141, n. 1, p. 363-367, 2012.

CILURZO, F. et al. Fast dissolving films made of maltodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 70, p. 895-900, 2008.

CIRRI, M.; MURA, P.; MORA, P. C. Liquid spray formulations of xibornol by using self-microemulsifying drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 340, n. 1-2, p. 84-91, 2007.

COELHO, M. H. M. et al. Ação antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais e da própolis em amostras de saliva. **Revista Brasileira de Odontologia**, Rio de Janeiro, v. 61, p. 12-15, 2004.

COLLINS, A. E.; DEASY, P. B. Bioadhesive lozenge for the improved delivery of cetylpyridinium chloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 79, n. 2, p. 116-119, 1990.

CROOKS, P. A.; AL-GHANANEEM, A. M. Drug Targeting to the lung: Chemical and Biochemical considerations. In: HICKEY, A. J. **Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology**; 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2003, p. 89-154.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. Química de Alimentos de Fennema. 4th ed. Porto Alegre: Artmed. 2010.

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.

DENIS, A. et al. Molecular weight determination of hydrolyzed colagens. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 22, p. 989-994, 2008.

DESHPANDE, A. A. et al. Evaluation of films used in development of novel controlled-release system for gastric retention. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 159, p. 255-258, 1997.

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

DUNCAN, A. et al. Modest hormonal effects os soy isoflavones in postmenopausal woen. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Baltimore, v. 84, n. 10, p. 3479-3484, 1999.

EL-KAMEL, A. H.; ASHRI, L. Y.; ALSARRA, A. Micromatrical metronidazole benzoate film as a local mucoadhesive delivery system for treatment of periodontal diseases. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 8, n. 3, p. E184-E194, 2007.

ELLEUCH, M. et al. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: characterisation, technological functionality and comercial applications: A review. **Food Chemistry**, London, v. 124, p. 411-421, 2011.

ESCUREDO, O. et al. Assessing *Rubus* honey value: pollen and phenolic compounds content and antibacterial capacity. **Food Chemistry**, London, v. 130, n. 3, p. 671-678, 2012.

FERNANDES JÚNIOR, A. et al. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 5, p. 563-566, 2005.

FIGUEIRA, A.; CARVALHO, R.; VAIGA, F. A mucosa bucal como uma via de administração alternativa: Potencialidades, limitações e formas farmacêuticas. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologia da Saúde**, v. 3, n. 1, p. 87-102, 2006.

FLORENCE, A. T.; ATTOWOOD, D. **Princípios Físico-químico em Farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Pulo, 2003.

FÖGER, F. et al. Correlation of in vitro and in vivo models for the oral absorption of peptides drugs. **Amino Acids**, Wien, v. 35, p. 233-241, 2008.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 52, p. 137-142, 2013.

GAHUKAR, R. T. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. **Crop Protection**, Guildford, v. 42, p. 202-209, 2012.

GAISFORD, S. et al. Monitoring crystallization of drugs from fast-dissolving oral films with isothermal calorimetry. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 380, p. 102-111, 2009.

GARCIA, R. C. et al. Efeito do extrato alcoólico sobre a *Pasteurella multocida* “in vitro” e em coelhos. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 26, p. 69-77, 2004.

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.

GBOGOURI, G. A. et al. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. **Food chemistry and Toxicology**, Oxford, v. 69, n. 9, p. C615-C622, 2004.

GENNADIOS, A.; WELLER, C. L.; HANNA, M. A.; FRONING, G. W. Mechanical and barrier properties of egg albumen films. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 61, p. 585-589, 1996.

GIBSON, J. et al. A controlled release pilocarpine buccal insert in the treatment of Sjogren's syndrome. **British Dental Journal**, London, v. 202, p. E17-E17, 2007.

GILBERT, B.; ALVES, L. F. Synergy in plant medicines. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, NL, v. 10, p. 13-20, 2003. , 2003

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Effect of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin-chitosan films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 6, p. 1461-1469, 2011.

GÓMEZ-ESTACA, J. et al. Physico-chemical and film-forming properties of bovine-hide and tuna-skin gelatin: A comparative study. **Journal of Food Engineering**, London, v. 90, n. 4, p. 480-486, 2009.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. et al. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011.

GONTARD, N. et al. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 1994, p. 39-50, 1994.

GORDON P. W. et al. Studies into the swelling of gelatin films using a scanning fluid dynamic gauge. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 88, n. 4, p. 357,-364, 2010.

GREGORIS, E.; STEVANATO, R. Correlations between polyphenolic composition and antioxidant activity of Venetian propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 76-82, 2010.

GRUENWALD, J.; FREDER, J.; ARMBRUESTER, N. Cinnamon and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 50, p. 822-834, 2010.

GUILLERMINET, F. et al. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An *in vitro* and *in vivo* study. **Bone**, New York, v. 46, p. 827-834, 2010.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 52, n. 6, p. 481-504, 2000.

HASHIDE, R. et al. Use of anionic polysaccharides for the preparation of insulin-containing layer-by-layer films and their pH stability. **Polymer Bulletin**, Berlin, v. 69, p. 229-239, 2012.

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

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 15, n. 8, p. 639-652, 2008.

HIRANI, J. J.; RATHOD, D. A.; VADALIA, K. R. Orally disintegrating tablets: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 8, n. 2, p. 161-172, 2009.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. **Food hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 1085-1095, 2011a.

HOQUE, M. S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Effect of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 82-90, 2011b.

HUANG, X.; XIAO, Y.; LANG, M. Micelles/sodium-alginate composite gel beads: A new matrix for oral drug delivery of indomethacin. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, n. 1, p. 790-798, 2012.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3rd ed.: **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. São Paulo: IMESP, 1985.

IWAI, K. et al. Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. **Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, p. 6531-6536, 2005.

JAIN, S. K. et al. Design and development of a mucoadhesive buccal film bearing progesterone. **Pharmazie**, Eschborn, v. 63, n. 2, p. 129-135, 2008

JIN, S.; YIN, Y. *In vivo* antioxidant activity of total flavonoids from indocalamus leaves in aging mice caused by D-galactose. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 3814-3818, 2012.

JOHNSTON-BANKS, F. Gelatin. In: HARRIS, P. **Food Gels**, Elsevier Applied Science, London, p. 233-289, 1990.

JORDAN, S. A.; CUNNINGHAM, D. G.; MARLES, R. J. Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge for safety assessment. **Toxicology and Applied Pharmacology**, San Diego, v. 243, p. 198-216, 2010.

JULIANO, C.; PALA, C. L.; COSSU, M. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Paris, v. 17, n. 3, p. 177-180, 2010.

KANGARLOU, S.; HARIRIAN, I.; GHOLIPOUR, Y. Physico-mechanical analysis of free ethyl cellulose films comprised with novel plasticizers of vitamin resources. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 356, p. 153-166, 2008.

KARBOWIAK, T.; DEBEAUFORT, F.; VOILLEY, A. Importance of surface tension characterization for food, pharmaceutical and packaging products: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 5, p. 391-407, 2006.

KEEVIL, J. G. et al. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v.130, p. 53-56, 2000.

KEITH, C. T.; BORISY, A. A.; STOCKWELL, B. R. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 4, n. 1, p. 71-78, 2005.

KOÇ, A. N. et al. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* ssp. And *Trichosporon* ssp. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont , v. 14, n. 1-2, p. 128-134, 2011.

KOLAND, M. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of chitosan buccal films of ondansetron hydrochloride. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, Mumbai, v. 1, n. 3, p. 164-171, 2011.

KOLAND, M.; CHARYULU, N.; PRABHU, P. Mucoadhesive films of losartan potassium for buccal delivery: desing and characterization. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 44, n. 4, p. 315-323, 2010.

KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Effect of the morphology of hydrophilic polymeric matrices on the diffusion and release of water soluble drugs. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 9, p. 211-227, 1981.

KORU, O. et al. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, London, v. 13, p. 140-145, 2007.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 3, p. 329-339, 2004.

KURRA, I. R.; RAO, L. J. M. An impression on current developments in the technology, chemistry, and biological activities of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 52, p. 651-688, 2012.

LAKSHMI, V. et al. Antifilarial activity *in vitro* and *in vivo* of some flavonoids tested against *Brugia malayi*. **Acta Tropica**, Basel, v. 116, n. 2, p. 127-133, 2010.

LANGMAIER, F. et al. Biodegradable packing materials based on waste collagen hydrolysate cured with dialdehyde starch. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 93, p. 547-552, 2008.

LANGMAIER, F. et al. Isolation of elastin and collagen polypeptides from long cattle tendons as raw material for cosmetic industry. **International Journal of Cosmetic Science**, London, v. 24, n. 5, p. 273-279, 2002.

LI, Z. et al. Influence of average molecular weight on antioxidant and functional properties of cartilage collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei* and *Raja porosa*. **Food Research international**, Barking, v. 51, n. 1, p. 282-293, 2013.

LIEW, K. B.; TAN, Y. T. F.; PEH, K. K. Characterization of oral disintegration film containing donepezil for Alzheimer disease. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 13, n. 1, p. 134-142, 2012.

LIU, X. et al. Immunomodulatory and anticancer activities of phenolics from emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.). **Food Chemistry**, London, v. 131, n. 2, p. 685-690, 2012.

LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Campinas, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

- LU, T. M. et al. Quality and antioxidant property of green tea sponge cake. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 3, p. 1090-1095, 2011.
- MAHESHWARI, R. K. et al. Multiple biological activities of curcumin: A short review. **Life Sciences**, Elmsford , v. 78, n. 18, p. 2081-2087, 2006.
- MANARA, L. R. B. et al. Utilização da própolis em odontologia. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru**, Bauru, Brasil, FOB, v. 7, n. 3-4, p. 15-20, 1999.
- MANDAL, B. B.; MANN, J. K.; KUNDU, S. C. Silk fibrion/gelatin multilayered films as a model system for controlled drug release. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 37, p. 160-171, 2009.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: a chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Les Ulis, França, v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARTINS, R. S. et al. O efeito do extrato commercial etanólico de própolis no crescimento *in vitro* de *Cândida albicans*, coletada de pacientes brasileiros HIV soropositivo e HIV soronegativo com candidíase oral. **Journal of Oral Science**, Tokyo, JP, v. 44, n. 1, p. 41-48, 2002.
- MASCHERONI, E. et al. Diffusivity of propolis compounds in Polylactic acid polymer for the development of anti-microbial packaging films. **Journal of Food Engineering**, London, v. 98, n. 3, p. 294-301, 2010.
- MATSUNO, T. A new clerodane diterpenoid isolated from propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 50c, p. 93-97, 1995.
- McNALLY, E. J.; PARK, J. Y. Peptides and Proteins: Oral Absorption. In: SWARBRICK, J. (Ed.). **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**. 3rd ed. New York: Informa Healthcare, USA, 2007. v. 4, p. 2713-2730.
- MEILLER, T. F. et al. Efficacy of Listerine antiseptic in reducing viral contamination of saliva. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 32, p. 341-346, 2005.
- MIRZOEVA, O. K. et al. Antimicrobial action of propolis and some of its components the effect on growth membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, Jena, v. 152, p. 239-246, 1997.
- MIYATAKA, H. et al. Evaluation of propolis. 1. Evaluation of Brazilian of Chinese propolis by enzymatic and physic-chemical methods. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 20, n. 5, p. 496-501, 1997.

MOHAMED, M. I.; HAIDER, M.; MOHAMED ALI, M. A. Buccal mucoadhesive films containing antihypertensive drugs: *In vitro/in vivo* evaluation. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Rajasthan, v. 3, p. 665-686, 2011.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Antioxidant power of Iranian propolis extract. **Food Chemistry**, London, v. 103, p. 729-733, 2007.

Moléculas: soluções para plastisóis. Disponível em:
<http://www.moleculas.com.br/2012/11/definicao-e-controle-da-cor/>. Acessada em 12/03/2013.

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.

MORIMURA, S. et al. Development of an effective process for utilization of collagen from livestock and fish waste. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 1403-1412, 2002.

MOSKOWITZ, R. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. **Seminars in arthritis and rheumatism**, Orlando, v.30, p.87-99, 2000.

MU, C. et al. Preparation and properties of dialdehyde carboxymethyl cellulose crosslinked gelatin edible films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 22-29, 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.

MURDAN, S.; ADRÝSEK, T.; SON, D. Novel gels and their dispersions – oral drug delivery systems for ciclosporin. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 300, n. 1-2, p. 113-124, 2005.

MUSSATTO, S. I. et al. Extraction of antioxidant phenolic compounds from spent coffee grounds. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 83, p. 173-179, 2011.

NABEKURA, T. et al. Inhibition of anticancer drug efflux transporter P-glycoprotein by rosemary phytochemicals. **Pharmacological Research**, London, v. 61, n. 3, p. 259-263, 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in food and nutraceuticals. 2nd ed. London : CRC Press, 2003.

NAGAR, P.; CHAUHAN, I.; YASIR, M. Insights into polymers: Film formers in mouth dissolving films. **Drug Invention Today**, v. 3, n. 12, p. 280-289, 2011.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. Tradução: ANVISA. Norma M2-A8. **Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por Disco-difusão**. Ed. 8, v. 23, p. 58, 2003.

NISHIGAKI, M. et al. Development of fast dissolving oral film containing dexamethasone as an antiemetic medication: Clinical usefulness. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 424, p. 12-17, 2012.

NISHIMURA, M. et al. *In vitro* and *in vivo* characteristics of prochlorperazine oral disintegrating film. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 268, p. 98-102, 2009.

NORI, M. P. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **Food Science and Technology**, London, v. 44, p. 429-435, 2011.

OESSER, S. et al. Oral administration of ^{14}C Labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, p. 1891-1895, 1999.

OHMORI, S. et al. Application of an electronic nose system for evaluation of unpleasant odor in coated tablets. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 59, n. 2, p. 289-297, 2005.

OJEDA-SANA, A. M. et al. New insights into antibacterial and antioxidant activities of Rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, Guildford, v. 31, n. 1, p. 189-195, 2013.

OLIVEIRA, A. C. et al. Antifungal activity of própolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 492-497, 2006.

ORTEGA, K .L. Effect of a topical antimicrobial paste on healing after extraction of molars in HIV positive patients: randomized controlled clinical trial. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Edinburgh, v. 45, p. 27-29, 2007.

OTTO, D. P. et al. Development of microporous drug-releasing films cast from artificial nanosized latexes of poly(styrene-*co*-methyl methacrylate) or poly(styrene-*co*-ethyl methacrylate). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, London, v. 69, n. 3, p. 1121-1134, 2008.

OZDAL, T.; CAPANOGLU, E.; ALTAY, F. L. A review on protein-phenolic interactions and associated changes. **Food Research International**, *In press: Accepted Manuscript*, 2013

PADERNI, C. et al. Oral local drug delivery and new perspective in oral drug formulation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, Saint Louis, v. 114, n. 3, p. e25-e34, 2012.

PARK, Y. K. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganism. **Current Microbiology**, New York, v. 34, n. 1, p. 24-28, 1998.

PASTOR, C. et al. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based film containing propolis as affected by moisture content. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 82, n. 4, p. 1174-1183, 2010.

PEH, K. K.; WONG, C. F. Polymeric films as vehicle for buccal delivery: Swelling, mechanical and bioadhesive properties. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 2, p. 53-61, 1999.

PEI, Y. et al. Fabrication, properties and bioapplications of cellulose/collagen hydrolysate composite films. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 92, n. 2, p. 1752-1760, 2013.

PEÑA, C. et al. Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition. **Bioresource Technology**, New York, v. 101, n. 17, p. 6836-6842, 2010.

PENG, X. et al. The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 1, p. 49-53, 2010.

PERIOLI, L. et al. Mucoadhesive bilayered tablets for buccal sustained release of flurbiprofen. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 8, n. 3, p. e20-e27, 2007

PERUMAL, V. A.; LUTCHMAN, D.; MACKRAJ, I.; GOVENDER, T. Formulation of monolayered films with drug and polymers of opposing solubilities. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 358, p. 184-191, 2008.

PETRONILHO, S. et al. In vitro and in vivo studies of natural products: A challenge for their valuation. The case study of chamomile (*Matricaria recutita* L.). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 40, p. 1-12, 2012.

PONGJANYAKUL, T.; PUTTIPIATKHACHORN, S. Alginate-magnesium aluminum silicate films: Effect of plasticizers on film properties, drug permeation and drug release from coated tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 333, n. 1-2, p. 34-44, 2007.

RAHMAN, K. Garlic and aging: new insights into an old remedy. **Ageing Research Reviews**, Kidlington, v. 2, n. 1, p. 39-56, 2003.

RANADE, V. V.; HOLLINGE, M. A. Drug Delivery Systems. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2003.

RASKIN, I. et al. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

RATTAYA, S.; BENJAKUL, S.; PRODPRAN, T. Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 95, p. 151-157, 2009.

REPKA, M. A.; PRODDUTURI, S.; STODGHILL, S. P. Production and characterization of hot-melt extruded films containing clotrimazole. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, New York, v. 29, p. 757-765, 2003.

RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano**. 2002. 143p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SANTOS, F. A. et al. Antimicrobial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 80, p. 1-7, 2002.

SANTOS, C. R. et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, p. 71-74, 2003.

SEHN, E. et al. Dynamics of reepithelialisation and penetration rate of a bee propolis formulation during cutaneous wounds healing. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 635, n. 1, p. 115-120, 2009.

SENEL, S. et al. Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 193, p. 197-203, 2000.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, p. 1-14, 2007.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 133, p. 253-260, 2011.

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.

SHOJAEI, A. H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1988.

SHUTAVA, T. G.; BALKUNDI, S. B.; LVOV, Y. M. (-)-Epigallocatechin gallate/gelatin layer-by-layer assembled films and microcapsules. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 330, n. 2, p. 276-283, 2009.

SIEVENS-FIGUEROA, L. et al. Preparation and characterization of hydroxypropyl methyl cellulose films containing stable BCS class II drug nanoparticles for pharmaceutical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 423, p. 496-508, 2012.

SILVA, J. C. et al. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, p. 1790-1795, 2012.

SILVA, W. A. et al. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, p. 154-163, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIONKOWSKA, A. et al. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, Guilford, v. 25, p. 795-801, 2004.

SOBRAL, P. J. A. et al. Mechanical, water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 15, p. 423-432, 2001.

SOBRAL, P. J. A. Influência da espessura de biofilmes feitos à base de proteínas miofibrilares sobre suas propriedades funcionais. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 5, n. 6, p. 1251-1259, 2000.

SONMEZ, S. et al. The effect of bee propolis on oral pathogens and human gingival fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 102, n. 3, p. 371-376, 2005.

SUÁREZ, B. et al. Phenolic profiles, antioxidant activity and in vitro antiviral properties of apple pomace. **Food Chemistry**, London, v. 120, n. 1, p. 339-342, 2010.

SULAIMAN, G. M. et al. Assessing the anti-tumour properties of Iraqi propolis *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1632-1641, 2012.

SULAIMAN, G. M. et al. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, p. 2415-2421, 2011.

SULTAN, M. T. et al. Utilization of *Nigella sativa* L. essential oil to improve the nutritive quality and thymoquinone contents of baked products. **Pakistan Journal of Nutrition**, Faisalabad, v. 11, n. 10, p. 812-817, 2012.

TAKEUCHI, K. et al. *In vitro* and clinical evaluation of an oral mucosal adhesive film containing indomethacin. **The Pharmaceutical Society of Japan**, Tokyo, v. 128, n. 12, p. 1791-1795, 2008.

TANG, M. et al. Preparation, characterization and properties of partially hydrolyzed ethylene vinyl acetate copolymer films for controlled drug release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 400, n. 1-2, p. 66-73, 2010.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Science**, Basel, v. 56, p.755-763, 1999.

ULUBAYRAM, K. et al. Desferrioxamine release from gelatin based systems. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, San Diego v. 42, p. 237-245, 2005.

VALENTE, M. J. et al. Biological activities of Portuguese propolis: protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 49, p. 86-92, 2011.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, p. 159-163 2004.

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**, Benin, v. 11, 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.

VICTORINO, F. R. et al. Antibacterial activity of propolis-based toothpastes for endodontic treatment. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 4, p. 795-800, 2009.

VUYST, L. D.; FALORY, G.; LEROY, F. Probiotics in fermented sausages. **Meat**, Chicago, v. 80, p. 75-78, 2008.

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.

WU, J. et al. Assessment of effectiveness of oral administration of collagen peptide on bone metabolism in growing and mature rats. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, Tokyo, v.22, p.547-553, 2004.

YAKIMETS, I. et al. Mechanical properties with respect to water content of gelatin films in glassy state. **Polymer**, London, v. 46, n. 26, p. 12577-12585, 2005.

YAN, M. et al. Physicochemical properties of gelatin gels from walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 25, p. 907-914, 2011.

ZHANG, A.; LI, G.; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, Redbourne, v. 90, p. 23-28, 2006.