UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

JOSIANE GONÇALVES BORGES

**Incorporação de compostos ativos naturais em matrizes poliméricas
para liberação oral utilizando a técnica de impressão**

PIRASSUNUNGA

2017

JOSIANE GONÇALVES BORGES

**Incorporação de compostos ativos naturais em matrizes poliméricas para
liberação oral utilizando a técnica de impressão**

(Versão corrigida)

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

Área de Concentração: Ciência da Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho.

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins

Pirassununga

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B732i Borges, Josiane Gonçalves
Incorporação de compostos ativos naturais em
matrizes poliméricas para liberação oral utilizando
a técnica de impressão / Josiane Gonçalves Borges ;
orientadora Rosemary Aparecida de Carvalho ;
coorientadora Daniele dos Santos Martins. --
Pirassununga, 2017.
135 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. Punica granatum. 2. carboximetilcelulose. 3.
tape-casting. 4. filmes orais. I. Carvalho,
Rosemary Aparecida de, orient. II. Martins, Daniele
dos Santos, coorient. III. Título.

JOSIANE GONÇALVES BORGES

Incorporação de compostos ativos naturais em matrizes poliméricas para
liberação oral utilizando a técnica de impressão

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

Área de Concentração: Ciência da
Engenharia de Alimentos.

Data da aprovação: 23/08/2017

Banca Examinadora:

Dr^a. Rosemary Aparecida de Carvalho – Presidenta da Banca Examinadora
Profa. da FZEA/USP

Dra. Anna Cecila Venturini – Membro
Profa. da UNIFESP

Dra. Cristiana Maria Pedroso Yoshida – Membro
Profa da UNIFESP

Dra. Fernanda Maria Vanin – Membro
Profa. da FZEA/USP

Dr. Severino Matias de Alencar – Membro
Prof. Da ESALQ/USP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela criação de tudo que existe e pela oportunidade a mim oferecida.

Agradeço aos meus queridos e amados pais, Paulo e Elizete, pelo carinho, dedicação e apoio durante todos os momentos da minha vida. Mesmo distantes estiveram sempre presentes.

Agradeço à minha orientadora, Professora Dra. Rosemary Aparecida de Carvalho, por acreditar no meu trabalho e por todos os momentos de incentivos, ensinamentos e paciência. Muito mais que uma orientadora, uma amiga que me fez crescer tanto no meu lado acadêmico como pessoal, um verdadeiro exemplo.

Agradeço à minha co-orientadora, Profa. Daniele dos Santos Martins pelo apoio e auxílio.

Aos meus irmãos, Cristiane e Romão, que sempre me apoiaram na minha caminhada. A distância física nunca permitiu que vocês não estivessem presentes em minha vida.

Ao meu companheiro de jornada, Juliano Henrique Lázaro, por sua atenção e carinho. Esteve sempre ao meu lado, nos dias felizes e estressantes, sempre me apoiando e me fazendo acreditar que daria certo. Obrigada por dividir comigo mais esta conquista.

Aos amigos da Pós-graduação, especialmente para Camila, Vitor, Carla (mais conhecida como Cacau), Débora, Mayra e Roberta (Alemã) pelas risadas e conversas, e por todo apoio e incentivo.

Ao meu amigo Vinícius Borges Vieira Maciel por todo apoio e auxílio para o desenvolvimento do projeto.

Às estagiárias do laboratório, Fabiana, Gabriela e Mariane pela ajuda sempre que precisei.

Agradeço aos amigos queridos, Ana Maria, Carolina, Leandro, Ricardo, Rodrigo, Silvia, Stela e Susana e aos demais amigos do Educandário Maria de Magdala pelas energias positivas.

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

À equipe da Pós-graduação por serem sempre prestativos e atenciosos.

Aos funcionários da biblioteca por toda a atenção.

Aos professores, Walter Velloso, Fernando Tonin, Eliria Pallone e João Adriano do Departamento de Engenharia de Biosistemas por permitirem a realização do Doutorado.

À Keila pela ajuda nas análises de viscosidade dos extratos.

Ao Leonardo pela ajuda nas análises de difração de raio-X.

Ao Rodrigo pela ajuda nas análises de Microscopia eletrônica de varredura e de força atômica.

Obrigada a todos que fizeram este trabalho ser possível!

Não bastava dizer que Deus existe e é onipresente, onipotente e onisciente, é preciso que ele exista em seu mundo como primeira referência de todo o resto. Se ele não existir em seu mundo ele não pode existir em nenhum outro lugar.

Karol Wojtyła

RESUMO

BORGES, J. G. **Incorporação de compostos ativos naturais em matrizes poliméricas para liberação oral utilizando a técnica de impressão.** 2017. 135f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A tecnologia de impressão para incorporação do princípio ativo tem se mostrado promissora para o desenvolvimento de filmes para liberação oral. Estudos mostram que esta técnica foi eficiente na incorporação de fármacos sintéticos, entretanto pode ser interessante avaliar a possibilidade do uso desta técnica para incorporação de extratos naturais, devido as diversas atividades farmacológicas que eles podem apresentar. Dentre as fontes naturais, a romã (*Punica granatum* L.) tem se destacado pelo seu potencial antioxidante, anti-inflamatório e antimicrobiano. Este trabalho teve como objetivo avaliar as diferentes partes da *Punica granatum* L. como fonte de compostos ativos e analisar a possibilidade do uso da técnica de impressão para incorporação destes compostos em substratos para liberação oral. A extração dos compostos ativos foi avaliada para as diferentes partes da romã (casca, folha, mesocarpo e semente) em relação ao rendimento de sólidos solúveis totais, concentração de compostos fenólicos e flavonoides. O melhor extrato foi concentrado em rotaevaporador e avaliado em relação aos parâmetros importantes para uma solução de impressão (tensão superficial e viscosidade). Para utilização como substrato foram avaliados filmes à base de carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda (CMC:HPMC - 1:1) produzidos pela técnica de *tape-casting* e papel comestível comercial. O extrato foi impresso utilizando uma impressora jato de tinta (L375, EPSON). Os substratos foram impressos com diferentes números de camada (1 à 4 camadas de impressão) e caracterizados em relação ao conteúdo de água, cor, pH de superfície, microscopia eletrônica de varredura e de força atômica, tempo de desintegração, concentração de compostos fenólicos, liberação *in vitro*, cinética de liberação, espectroscopia de infravermelho, difração de raio-X e estabilidade dos compostos fenólicos. A melhor extração foi obtida do mesocarpo, utilizando-se a temperatura de 70 °C, tempo de 30 min e solução hidroalcoólica com 70% de álcool. Observou-se que os extratos obtidos do mesocarpo (sem e com concentração) apresentaram intervalos de valores de tensão superficial e viscosidade dentro dos valores observados na literatura para impressora, entretanto o extrato obtido do mesocarpo com remoção de 40% de solvente apresentou maior concentração de compostos fenólicos e por isso foi utilizado como

solução de impressão. Analisando os substratos, observou-se que os filmes obtidos por *tape-casting* apresentaram maior tensão na ruptura, elongação e módulo elástico que o papel comestível comercial. Adicionalmente, os extratos apresentaram boa afinidade com os substratos testados. Os filmes à base de HPMC e blenda de CMC:HPMC não foram utilizados para impressão por curvarem rapidamente após serem retirados da placa, visto que essa deformação impediu que passassem pela cabeça de impressão sem serem danificados. Em relação aos filmes impressos, observou-se que o aumento do número de camadas aumentou a concentração de compostos fenólicos, possibilitando a produção sob demanda, de acordo com a necessidade individual. Não houve variação do pH de superfície e o tempo de desintegração do papel comestível comercial foi superior aos filmes à base de carboximetilcelulose. A liberação dos compostos foi influenciada pelo substrato utilizado e o lado de exposição (lado sem impressão e lado impresso). Os compostos fenólicos foram estáveis nos filmes no intervalo de 196 dias. Desta forma, pode-se concluir que a técnica de impressão pode ser utilizada para incorporação dos compostos fenólicos extraídos do mesocarpo da romã.

Palavras-chave: *Punica granatum*, carboximetilcelulose, *tape-casting*, filmes orais.

ABSTRACT

BORGES, J. G. **Incorporation of natural active compounds into polymer matrices for oral release using the printing technique.** 2017. 135f. Thesis (PhD) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2017.

Printing technology for incorporation of the active compounds has shown promise for the development of oral release films. Studies show that this technique was efficient in the incorporation of synthetic drugs, however it may be interesting to evaluate the possibility of using this technique to incorporate natural extracts, due to the various pharmacological activities that they can present. Among the natural sources, pomegranate (*Punica granatum* L.) has been highlighted by its antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial potential. This work aimed to evaluate the different parts of *Punica granatum* L. as a source of active compounds and to analyze the possibility of using the printing technique to incorporate these compounds into substrates for oral release. The extraction of the active compounds was evaluated for different parts of the pomegranate (bark, leaf, mesocarp and seed) in relation to the yield of total soluble solids, concentration of phenolic compounds and flavonoids. The best extract was concentrated in a rotavaporator and evaluated in relation to the parameters important for a printing solution (surface tension and viscosity). Films based on carboxymethylcellulose (CMC), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) and blend (CMC: HPMC - 1: 1) produced by the tape-casting technique and commercial edible paper were evaluated for use as substrate. The extract was printed using a piezoelectric inkjet printer (L375, EPSON). The substrates were printed with different numbers of layers (1 to 4 printing layers) and characterized in relation to water content, color, surface pH, scanning and atomic force electron microscopy, disintegration time, phenolic compound concentration, release *in vitro*, release kinetics, infrared spectroscopy, X-ray diffraction and stability of phenolic compounds. The best extract was obtained from the mesocarp, using the extraction temperature of 70°C, time of 30 min and hydroalcoholic solution with 70% ethyl alcohol. It was observed that the extracts obtained from the mesocarp (without concentration and with different percentages of concentration) presented ranges of values of surface tension and viscosity within the values observed in the literature for printer, and the extract with removal of 40 % of solvent present higher concentration of phenolic compounds and therefore was used as print

solution. By analyzing the substrates, it was observed that the films obtained by tape-casting had a higher tension in the rupture, elongation and elastic modulus than commercial edible paper. In addition, the extracts showed good affinity with the substrates tested. HPMC-based films and blends (HPMC:CMC) were not used for printing by bending rapidly after being removed from the plate as this deformation prevented them from passing through the print head without being damaged. In relation to the printed films, it was observed that the increase in the number of layers also increased the concentration of phenolic compounds, allowing the production on demand, according to the individual needs. There was no variation of the surface pH and the disintegration time of the commercial edible paper was higher than the carboxymethylcellulose based films. The release of the compounds was influenced by the substrate used and the exposure side (unprinted side and printed side). The phenolic compounds were stable in the films within the 196 day. In this way, it can be concluded that the printing technique can be used to incorporate the phenolic compounds extracted from the mesocarp of the pomegranate.

Keywords: *Punica granatum*, carboxymethylcellulose, tape-casting, oral films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia da cavidade oral.	25
Figura 2 - Propriedades das principais categorias de filmes orais.....	32
Figura 3 - Impressão sob demanda para indivíduos com necessidades diferentes de fármacos, sendo que a variação de cores representa soluções de impressão diferentes (por exemplo, com diferentes fármacos).	36
Figura 4 - Sistema de impressão jato de tinta contínuo.....	37
Figura 5 - Esquema de funcionamento de dispositivo jato de tinta térmico: (a) câmara antes da distribuição; (b) microresistor aquece uma fina película da solução de tinta; (c) formação e expansão da bolha; (d) formação da gota; (e) a bolha colapsa e flui solução do reservatório; e (f) a câmara é recarregada.	39
Figura 6 - Esquema da tecnologia Piezoelétrico para impressão.	40
Figura 7 - Esquema da tecnologia flexográfica para impressão.....	40
Figura 8 - Divisão morfológica da romã.	49
Figura 9 - Impressora Epson L375 com tanque de tinta lateral.....	64
Figura 10 - Janela de propriedades de impressão da Epson L375 da ferramenta de impressão do programa Microsoft Word 2013.	64
Figura 11 - Extratos solidificados do mesocarpo de romã obtidos utilizando-se como solvente álcool etílico 50%, temperatura de extração igual à 70°C e diferentes tempos de extração: (a) 15 minutos e (b) 30 minutos.	71
Figura 12 - Variação em relação ao tempo do ângulo de contato entre o extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, com porcentagem de concentração igual a 40%, sobre os substratos: papel comestível comercial (PC), filmes a base de carboximetilcelulose (CMC), filmes a base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda (B) de HPMC:CMC (1:1).	82
Figura 13 - Substratos para impressão, sendo eles: (a) - papel comestível comercial; (b) - filme à base de carboximetilcelulose; (c) - blenda à base de carboximetilcelulose:hidroxipropilcelulose (1:1); e (d) - filme à base de hidroxipropilcelulose.	83
Figura 14 - Parte interna da impressora Tanque de tinta L365 (Epson).....	84
Figura 15 - Sólido de cor do sistema CIE Lab.	87
Figura 16 - Extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã com porcentagem de concentração igual a 40 % utilizando-se rotaevaporador.	88
Figura 17 - Imagens dos substratos (papel comestível comercial e dos filmes à base de carboximetilcelulose) impressos com diferente números de camadas de impressão de extrato	

hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão; (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; e (4) - com 4 camadas de impressão.....	89
Figura 18 - Micrografias da superfície do papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilulose impressos com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, contendo diferentes números de camadas de impressão.	93
Figura 19 - Imagens de microscopia de força atômica da superfície em 2 dimensões (2D) e 3 dimensões (3D) dos filmes à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; e (4) - com 4 camadas de impressão.....	96
Figura 20 - Imagens obtidas no microscópio de força atômica da borda do filme à base de carboximetilcelulose sem impressão e com 1 camada de impressão2 dimensões (2D) e 3 dimensões (3D).....	97
Figura 21 - Liberação de compostos fenólicos do papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã para os dois lados do substrato, com lado sem impressão em contato com a solução tampão (a) e lado com impressão em contato com a solução (b), com diferentes números de camada de impressão sendo: (1) - 1 camada de impressão; (2) - 2 camadas de impressão; (3) - 3 camadas de impressão; e (4) - 4 camadas de impressão.....	101
Figura 22 - Liberação de compostos fenólicos do filme a base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã para os dois lados do substrato, com lado sem impressão em contato com a solução tampão (a) e lado com impressão em contato com a solução (b), com diferentes números de camada de impressão sendo: (1) - 1 camada de impressão; (2) - 2 camadas de impressão; (3) - 3 camadas de impressão; e (4) - 4 camadas de impressão.	102
Figura 23 - Amostras de substratos impressos com 4 camadas de impressão em solução tampão fosfato salino (pH 6,8), sendo (a) - papel comestível comercial antes da análise de liberação; (b) filme à base de carboximetilcelulose antes da análise de liberação; (c) papel comestível comercial após análise de liberação; (d) filme á base de carboximetilcelulose depois da análise de liberação.	103
Figura 24 - Espectros de absorção de infravermelho para papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) -	

com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; (4) - com 4 camadas de impressão.	113
Figura 25 - Espectros de absorção de infravermelho para filme à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; (4) - com 4 camadas de impressão.....	114
Figura 26 - Difrátogramas de raio-X para papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; (4) - com 4 camadas de impressão.	115
Figura 27 - Difrátogramas de raio-X para filme à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; e (4) - com 4 camadas de impressão.	116
Figura 28 - Estabilidade dos compostos fenólicos do papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã com diferentes números de camadas de impressão: PC1 - 1 camada; PC2 - 2 camadas; PC3 - 3 camadas; e PC4 - 4 camadas.	117
Figura 29 - Estabilidade dos compostos fenólicos do filme à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã com diferentes números de camada de impressão: CMC1 - 1 camada; CMC2 - 2 camadas; CMC3 - 3 camadas; e CMC4 - 4 camadas.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Veículos de liberação de compostos ativos na cavidade buccal.	26
Tabela 2 - Exemplo de filmes orais comerciais disponíveis no exterior	29
Tabela 3 - Patentes de filmes orais	30
Tabela 4 - Exemplo de estudos relacionados com a produção de filmes de desintegração oral com a incorporação de princípios ativos.	31
Tabela 5 - Exemplos de filmes de desintegração oral produzidos utilizando-se a técnica de impressão.	42
Tabela 6 - Exemplo de polímeros utilizados na produção de filmes orais.	44
Tabela 7- Estudos para aplicação do extrato de diferentes partes da romã.	50
Tabela 8 - Condições de extração utilizadas para a produção de extratos a partir de diferentes partes da <i>Punica granatum</i> (casca, folha, mesocarpo e semente): temperatura, tempo de extração e soluções hidroalcoólicas com diferentes porcentagens de álcool etílico.	57
Tabela 9 - Porcentagem de concentração dos extratos obtidos do mesocarpo de romã utilizando-se um rotaevaporador.	60
Tabela 10 - Formulações dos filmes orais em relação a massa de carboximetilcelulose (m_{CMC}), massa de hidroxipropilmetilcelulose (m_{HPMC}) e altura do espalhador.	61
Tabela 11 - Modelos matemáticos utilizados na avaliação dos mecanismos da cinética de liberação dos compostos fenólicos em filmes de desintegração oral.	68
Tabela 12 - Rendimento de sólidos solúveis totais de extratos obtidos da casca, folha, mesocarpo e semente de romã em função da temperatura de extração (T), tempo de extração (t) e soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações de álcool etílico (C_{etanol}).	70
Tabela 13 - Concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{fenólicos}}$) dos extratos obtidos da casca, folha, mesocarpo e semente de romã em função da temperatura de extração (T), tempo de extração (t) e soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações de álcool etílico (C_{etanol}).	72
Tabela 14 - Concentração de flavonoides ($C_{\text{Flavonoides}}$) dos extratos obtidos da casca, folha, mesocarpo e semente de romã em função da temperatura de extração (T), tempo de extração (t) e soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações de álcool etílico C_{etanol} (%).	74
Tabela 15 - Viscosidade dinâmica (τ) e viscosidade cinemática (ν) dos extratos hidroalcoólicos obtido do mesocarpo de romã sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração.	76

Tabela 16 - Tensão superficial dos extratos hidroalcoólico do mesocarpo de romã sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração.....	77
Tabela 17 - Concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{Fenólicos}}$) dos extratos hidroalcoólico do mesocarpo de romã sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração.	78
Tabela 18 - Espessura (mm), tensão na ruptura (T), elongação (E) e módulo elástico (ME) dos diferentes substratos livres de compostos ativos: papel comestível comercial (PC), filmes à base de carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda de CMC: HPMC (1:1).	79
Tabela 19 - Ângulo de contato entre os extratos hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração, e dos diferentes substratos livres de compostos ativos: papel comestível comercial (PC), filmes à base de carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda de CMC: HPMC (1:1).	81
Tabela 20 - Conteúdo de água (CA) dos substratos (papel comestível comercial e do filme à base de carboximetilcelulose) impresso com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.....	85
Tabela 21 - Luminosidade (L^*), croma a^* (a^*) e croma b^* (b^*) dos substratos (papel comestível comercial e filme à base de carboximetilcelulose) impressos com diferentes números de camada de impressão.	87
Tabela 22 - pH de superfície dos substratos (papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilcelulose) impressos com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.....	90
Tabela 23 - Tempo de desintegração do papel comercial e dos filmes à base de carboximetilcelulose com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.....	98
Tabela 24 - Variação da concentração de compostos fenólicos devido ao aumento do número de camadas de impressão do extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã em papel comestível comercial e filme à base de carboximetilcelulose.....	99
Tabela 25 - Regressão linear da concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{Fenólicos}}$) em relação ao número de camadas de impressão do extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã para cada substrato.....	99

Tabela 26 - Modelos matemáticos de cinética de liberação de compostos fenólicos de papel comestível comercial (PC) com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.....	108
Tabela 27 - Modelos matemáticos de cinética de liberação de compostos fenólicos de filmes à base de carboximetilcelulose (CM) com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.....	109
Tabela 28 - Fator de diferença (f_1) para perfil de liberação de compostos fenólicos de papel comestível comercial (PC) e filmes à base de carboximetilcelulose (CM) com diferentes número de camada de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.....	110
Tabela 29 - Fator de similaridade (f_2) para perfil de liberação de compostos fenólicos de papel comestível comercial (PC) e filmes à base de carboximetilcelulose (CM) com diferentes número de camada de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.....	111

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1	Mucosa bucal	24
3.2	Filmes orais.....	28
3.3	Métodos de produção de filmes	33
3.3.1	Métodos de impressão de compostos ativos.....	37
3.4	Polímeros para produção de filmes.....	43
3.5	Compostos ativos naturais	47
3.5.1	Romã.....	48
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1	Material.....	53
4.1.1	Reagentes.....	53
4.1.2	Material.....	53
4.1.3	Equipamentos	54
4.2	Etapas realizadas no projeto.....	55
4.3	Produção dos extratos	56
4.4	Caracterização dos extratos	57
4.4.1	Rendimento de sólidos solúveis totais.....	57
4.4.2	Concentração de compostos fenólicos.....	58
4.4.3	Concentração de flavonoides.....	58
4.5	Caracterização do extrato para impressão	59
4.5.1	Concentração em rotaevaporador	59
4.5.2	Viscosidade.....	60

4.5.3	Tensão superficial.....	60
4.5.4	Concentração de compostos fenólicos dos extratos concentrados	61
4.6	Produção dos filmes orais por tape-casting	61
4.7	Caracterização dos filmes livres de compostos ativos.....	62
4.7.1	Propriedades mecânicas.....	62
4.7.2	Ângulo de contato.....	63
4.8	Produção dos filmes impressos.....	63
4.9	Caraterização dos filmes impressos	65
4.9.1	Conteúdo de água	65
4.9.2	Cor	65
4.9.3	pH de superfície.....	65
4.9.4	Microscopia eletrônica de varredura	66
4.9.5	Microscopia de força atômica.....	66
4.9.6	Tempo de desintegração	66
4.9.7	Concentração dos compostos fenólicos.....	67
4.9.8	Liberação <i>in vitro</i>	67
4.9.9	Cinética de liberação	67
4.9.10	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	69
4.9.11	Difração de raio-x.....	69
4.9.12	Análise de estabilidade	69
4.10	Análise estatística.....	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	Caracterização dos extratos	70
5.1.1	Rendimento de sólidos solúveis totais.....	70
5.1.2	Concentração de compostos fenólicos.....	71
5.1.3	Concentração de flavonoides.....	73
5.2	Caracterização do extrato para impressão	75

5.2.1	Viscosidade.....	75
5.2.2	Tensão superficial.....	76
5.2.3	Concentração de compostos fenólicos.....	77
5.3	Caracterização dos filmes livres de compostos ativos.....	78
5.3.1	Propriedade mecânica.....	78
5.3.2	Ângulo de contato.....	79
5.3.3	Escolha do substrato para impressão	82
5.4	Caracterização dos filmes com incorporação de extrato do mesocarpo de romã utilizando-se o método de impressão	84
5.4.1	Conteúdo de água	84
5.4.2	Cor	86
5.4.3	pH de superfície.....	89
5.4.4	Microscopia eletrônica de Varredura	91
5.4.5	Microscopia de força atômica.....	94
5.4.6	Tempo de desintegração	97
5.4.7	Concentração de compostos fenólicos.....	98
5.4.8	Liberação <i>in vitro</i>	100
5.4.9	Cinética de liberação	103
5.4.10	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	112
5.4.11	Difração de Raio-X.....	114
5.4.12	Estabilidade	117
6	CONCLUSÕES	119
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	121

1 INTRODUÇÃO

A cavidade oral é altamente vascularizada o que permite que os compostos absorvidos pela sua mucosa sejam levados diretamente para a circulação sistêmica, evitando assim a degradação devido às variações de pH, ação enzimática do trato gastrointestinal e ao metabolismo hepático de primeira passagem (SHOJAEI, 1998). Desta forma, a mucosa bucal representa uma via importante para absorção de compostos ativos e nutrientes. Entre as formas de administração de compostos ativos na cavidade bucal os filmes orais têm se destacado devido a sua facilidade de administração e por serem mais confortáveis devido a sua fina espessura (MOHAMED; HAIDER, ALI, 2011).

Os filmes orais são produzidos principalmente pela técnica de *casting* ou por extrusão, sendo que o primeiro é o mais utilizado devido as altas temperaturas empregadas pelo método de extrusão que podem degradar os compostos termosensíveis (DIXIT; PUTHLI, 2009). Por outro lado, para a produção de filmes em geral, a técnica de *casting* apresenta longo tempo de secagem, dificultando a sua utilização em escala industrial (MORAES et al., 2013). Além disso, nestes dois métodos, o princípio ativo é incorporado na formulação antes da formação do filme, isto é, os compostos termosensíveis podem ser afetados pelos processos de produção, transporte e estocagem (GENINA et al., 2013b). Desta forma, outras alternativas são necessárias para o desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas de produção e incorporação dos compostos ativos nestes filmes.

Uma opção, recentemente explorada, é a incorporação de princípios ativos utilizando-se a técnica de impressão associada aos métodos convencionais de produção de filmes. Na técnica de impressão o composto é depositado com precisão e em pequenas quantidades sobre a matriz polimérica no final do processo (BUANZ et al., 2015). Desta forma, é possível a utilização de temperaturas mais elevadas na produção e secagem dos filmes, o que pode viabilizar a produção de filmes com princípio ativo em escala industrial.

Adicionalmente, a concentração de princípio ativo pode ser controlada pela impressão em multicamadas, o que permite dosagens mais precisas, dependendo da necessidade de cada paciente (BUANZ et al., 2011).

Atualmente, podemos citar diversos estudos que já avaliaram a incorporação de diferentes fármacos sintéticos utilizando-se o método de impressão, como por exemplo, sulfato de salbutamol (BUANZ et al., 2011), propanolol e riboflavina (GENINA et al., 2012), mesilato de rasagilina (GENINA et al., 2013; JANßEN et al., 2013) e clonidina (BUANZ et al., 2015). No entanto, vale destacar que não foram reportados, até o momento, a utilização desta técnica para a incorporação de extratos naturais em matrizes poliméricas para liberação oral.

Uma característica interessante é que os extratos de plantas possuem diversos compostos ativos, fazendo com que apresentem diferentes funcionalidades, além de, em alguns casos, serem mais eficientes devido ao efeito sinérgico entre os compostos do extrato (RASOANAIVO et al., 2011).

Dentre os compostos ativos presentes nas plantas pode-se destacar os compostos fenólicos, pois são amplamente reportados por prevenir doenças bucais (PETTI; SCULLY, 2009; LOLAYEKAR; SHABHAG, 2011) e feridas dérmicas (GEETHALAKSHMI et al., 2013), e ainda por apresentar atividade anti-inflamatória (BENSAAD et al., 2017) e antimicrobiana (MISHRA et al., 2017).

Diversas fontes naturais têm sido estudadas, visando a extração de seus compostos ativos, sendo que algumas fontes já foram incorporadas em filmes de liberação oral utilizando-se a técnica de *casting*. Daud, Sepkal e Bonde (2011) incorporaram extrato de gengibre em filmes de desintegração oral à base de hidroxipropilmetilcelulose e os autores observaram, em testes clínicos, que os filmes foram eficientes em condições clínicas diferentes: náuseas, vômitos induzidos pela gravidez, enjoo, tosse e anorexia. Borges e

Carvalho (2015) adicionaram extrato de própolis em filmes à base de gelatina e colágeno hidrolisado e observaram que os filmes aditivados apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. aureus*.

Dentre outras fontes de compostos ativos naturais podemos destacar a romã (*Punica granatum*). A romã é rica em compostos ativos, dentre os quais podemos salientar os compostos fenólicos (FISCHER et al., 2013; MIDDHA; USHA; PANDE, 2013). A presença destes compostos pode conferir aos extratos de romã propriedades como atividade antimicrobiana (LAHAM; FADEL, 2013), anti-inflamatória (BEKIR et al., 2013), antioxidante (BEKIR et al., 2013), e cicatrizante (NAYAK et al., 2013).

DiSilvestro et al. (2009) avaliaram a influência do extrato diluído de romã comercial (PomElla®), em jovens adultos (entre 19 e 25 anos), em relação a saúde bucal, e verificaram que o grupo recebeu extrato diluído de romã como enxaguante bucal (3 vezes por dia durante 4 semanas), apresentaram melhoria na saúde bucal, sugerindo a possibilidade da adição de extrato de romã em produtos como pasta de dente e enxaguante bucal (DiSilvestro et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar as diferentes partes da *Punica granatum* L. como fonte de compostos ativos com diferentes parâmetros de extração, bem como desenvolver e caracterizar filmes para liberação oral aditivados com extrato hidroalcoólico de romã utilizando-se a técnica de impressão.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de matrizes poliméricas para liberação oral aditivadas com extrato hidroalcoólico de romã utilizando-se a técnica de impressão para a incorporação dos mesmos.

2.2 Objetivos específicos

Dentre os objetivos específicos deste projeto estão:

- Avaliar o processo de extração (concentração de etanol em solução hidroalcoólica, temperatura e tempo de extração) das diferentes partes da romã (casca, folha, mesocarpo e semente) em relação a concentração de compostos fenólicos e flavonoides;
- Avaliar o potencial do uso do extrato como solução de impressão;
- Desenvolver e caracterizar de diferentes formulações de filmes para liberação oral pelo método de impressão;
- Avaliar a liberação *in vitro* e a estabilidade dos compostos ativos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Mucosa bucal

A absorção de compostos ativos pela mucosa bucal tem ganhado cada vez mais destaque por apresentar diversas vantagens em relação a outras vias de absorção. Na absorção dos fármacos pela mucosa bucal, a passagem pelo trato gastrointestinal é evitada, reduzindo a degradação do composto ativo devido à ação de enzimas digestivas, às variações de pH e ao metabolismo hepático de primeira passagem (SHOJAEI, 1998). E, por se tratar de uma região ricamente vascularizada os compostos absorvidos são carregados diretamente para a circulação sistêmica (SHOJAEI, 1998).

A via de absorção transdermal também é muito utilizada devido à facilidade de administração e à grande extensão do tecido cutâneo, entretanto ele apresenta uma camada superficial de proteção, que é queratinizada, que dificulta absorção dos compostos ativos (HEARNDEN et al., 2012).

Na cavidade bucal (Figura 1), as regiões que são submetidas ao estresse mecânico, como a gengiva e o palato duro, apresentam uma camada queratinizada, assim como a pele (SHOJAEI, 1998). Entretanto, a mucosa do palato mole, sublingual e a região interna da bochecha (Figura 1) não apresentam essa camada queratinizada, permitindo que essas regiões tenham uma maior permeabilidade (SHOJAEI, 1998). Estima-se que a mucosa bucal possua uma permeabilidade de 4-4000 vezes maior à da derme, sendo que a mucosa sublingual apresenta a maior permeabilidade, seguida pela bucal e depois palato mole (SHOJAEI, 1998).

Figura 1 - Anatomia da cavidade oral.

Fonte (adaptada): National Center Institute. **General Information About Lip and Oral Cavity Cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/lip-mouth-treatment-pdq>. Acessado em: 12/02/2017 (tradução nossa).

Entretanto, a veiculação de compostos ativos pela mucosa bucal apresenta alguns desafios, tais como: necessidade de sabor agradável, de permeabilidade seletiva da mucosa bucal e de evitar que os compostos ativos sejam carregados para o trato gastrointestinal devido ao processo natural de mastigação e salivagem (HEARNDEN et al., 2012).

Em função do acima exposto, verifica-se a importância do desenvolvimento ou aprimoramento dos mecanismos para veicular os fármacos e nutrientes na cavidade oral, buscando garantir uma aceitação sensorial do produto, assim como uma liberação e absorção mais efetiva destes compostos.

Na literatura são reportados diversos veículos para liberação na cavidade oral como hidrogel, filmes, emulsão, comprimidos e adesivos (Tabela 1).

Tabela 1 - Veículos de liberação de compostos ativos na cavidade buccal.

Veículo	Composto ativo	Funcionalidade	Referência
Tabletes	Cloridrato de Propranolol	Hipertensão e arritmia cardíaca	Abruzzo et al., 2015
Filmes	Nanoesferas com aciclovir	Herpes simples	Al-Dhubiab et al. (2015)
Hidrogel	Cloridrato de lindocaína	Anestésico	Xu et al. (2015)
Hidrogel	Sulfato de Salbutamol	Bonquite, asma e enfisema	Zeng et al. (2015)
Esponjas laminadas	Carvediol	Problemas cardiovasculares	Abd-Elbary et al., (2016)
Adesivo (Patches)	Nanopartículas de insulina	Diabetes	Barzoki et al. (2016)
Filmes	Omeprazol	Problema estomacal	Khan et al. (2016)
Emulsão	Enoxaparina	Anticoagulante	Zupančič et al. (2016)
Emulsão	Nistatina	Candidíase	Kassem et al., (2016)
Tabletes	Diazepam	Sedativo	Meng-Lund et al. (2016)
Tabletes	Clonazepam	Transtorno de ansiedade e convulsão	Mura et al. (2016)
Filmes	Ondansetrone	Náusea e vômito	Transtullo et al. (2016)
Filmes	Fluticasona	Anti-inflamatório	Ammar et al (2017)
Filmes	Extrato seco de acerola	Liberação de vitamina C	Garcia et al. (2017)
Filmes	Extrato da casca de amendoim	Liberação de compostos fenólicos	Tedesco et al. (2017)
Filmes	Nicotina	Tabagismo	Okeke, Boateng (2017)

Fonte: Própria autoria

Com base na Tabela 1, observa-se uma grande diversidade de compostos ativos que podem ser incorporados em sistemas para liberação oral. Todos esses veículos de liberação

de compostos ativos apresentam suas vantagens e desvantagens, e a escolha do sistema vai depender da necessidade e aplicação.

No caso de formas de dosagem líquida, compreendendo “sprays” e enxaguantes, o composto ativo fica suspenso em uma solução aquosa (PATEL; LIU; BROWN, 2011), sendo que esses veículos são utilizados, geralmente, para a ação local, como enxaguantes bucais e antimicrobianos (PATEL et al., 2011). Eles são fáceis de serem manipulados, porém apresentam a desvantagem de serem facilmente levados pelo processo natural de salivação e mastigação, sendo, desta forma, difícil controlar com precisão a liberação do fármaco na cavidade oral (PATEL et al., 2011).

Já os comprimidos e pastilhas são formulações secas que quando umedecidos pela saliva podem aderir a mucosa bucal, podendo ser utilizados tanto para liberação local quanto sistêmica (SUDHAKAR et al., 2006, PATEL et al., 2011). Além disso, pelo seu tamanho, eles podem veicular uma maior concentração de compostos ativos (BALA et al., 2013). Entretanto, devido ao seu tamanho, apresenta como desvantagens: desconforto para o paciente; e a possibilidade de se romper, desgrudando da mucosa bucal, podendo grudar na parede do esôfago quando engolido (PATEL et al., 2011).

Outra forma de dosagem é por meio de filmes orais que por serem mais finos e flexíveis podem apresentar maior conforto e aceitabilidade pelos pacientes em comparação com os comprimidos (PATEL et al., 2011). Em comparação com as soluções líquidas os filmes apresentam maior precisão da dosagem e são mais fáceis de serem administrados (LAM et al., 2014). Além disso, por não necessitarem de água para a sua administração, eles são adequados também para pessoas com dificuldade de deglutição (BALA et al., 2013).

Os filmes de desintegração oral têm se destacado em relação aos outros veículos de liberação local devido a sua facilidade de manuseio e aceitabilidade. Entretanto, tornam-se

necessários os estudos dessas matrizes para veicular outras fontes de compostos ativos, bem como novos métodos de produção e de incorporação de compostos ativos.

3.2 Filmes orais

Os filmes orais possuem espessura ideal inferior a 1 mm, para uma aplicação mais fácil na mucosa oral (KIANFAR et al., 2012). Eles são compostos basicamente de polímeros, agentes plastificantes e compostos ativos de interesse (DIXIT; PUTHLI, 2009). No entanto, para melhor a aceitação dos consumidores, podem ser adicionados outros compostos como agentes flavorizantes, corantes e edulcorantes (DIXIT; PUTHLI, 2009; KIANFAR et al., 2012; BALA et al., 2013).

Os filmes apresentam diversas vantagens, tais como facilidade de manuseio e transporte; não necessitam de água para sua administração, podem ser utilizados por pessoas com dificuldade de deglutição; e, por não sofrer a degradação do trato gastrointestinal e do metabolismo hepático, podem ser utilizadas concentrações menores do princípio ativo (DIXIT; PUTHLI, 2009). Além disso, podemos destacar que por serem mais finos e flexíveis, quando comparado com os tabletes e pastilhas, eles apresentam uma melhor aceitação pelos pacientes (PATEL et al., 2011).

Do ponto de vista comercial, os primeiros filmes orais foram desenvolvidos pela empresa farmacêutica Pfizer denominado “Listerine® pocket packsTM” para utilização como refrescante bucal (BALA et al., 2013). Já Chloraseptic® foi o primeiro filme oral para uso terapêutico, contendo como princípio ativo a benzocaína, utilizada para o tratamento de dor de garganta (BALA et al., 2013).

No Brasil, o Trimetal Tosse®, contendo bromidrato de dextrometorfano, da empresa Novartis Biociencias, pode ser encontrado comercialmente para o alívio de tosse. No

exterior, diversos filmes para liberação oral podem ser encontrados comercialmente, como observado na Tabela 2.

Tabela 2 – Exemplo de filmes orais comerciais disponíveis no exterior

Nome comercial	Princípio ativo	Funcionalidade
TBX-FREE®	Nicotina	Ajuda para parar de fumar
Niquitin Strips®		
Sumnulent®	Melatonina	Restaura o ciclo natural do sono
NeoCitran®	Dextrometorfano	Redução da tosse
Gas-X®	Simeticona	Tratamento de gases
Sandoz®	Sildenafil	Restauração da função erétil
Triaminic Thin Strips®	Dextrometorfano e fenilefrina	Tosse e resfriado
	Cloridrato de difenidramina	Anti alérgico
ZenTrip®	Cloridrato de meclizina	Tratamento de náuseas e vômitos
Setofilm®	Ondansetrona	

Tabela formulada a partir dos dados obtidos da fonte: Drug Index A to Z. Disponível em: https://www.drugs.com/drug_information.html. Acessado em 10/04/2017.

Vale ressaltar que os filmes de desintegração podem ser utilizados para incorporar diversos compostos, sendo isso um fator determinante para a sua funcionalidade. Neste sentido, tem aumentado o número de patentes já registradas (Tabela 3) e artigos (Tabela 4) relacionados a filmes orais com diversos compostos ativos e diferentes funcionalidades terapêuticas utilizadas.

Tabela 3 - Patentes de filmes orais

Nº da Patente	Princípio ativo	Funcionalidade	Referência
WO2011117313-A1	Ondansetron	Tratamento de disfagia, Alzheimer e Parkinson	Costantini et al. (2011)
US2011160264-A1	Ondansetrona	Prevenir náusea e vômito,	Myers et al. (2011)
JP2012056948-A	Topiramato	Tratamento de epilepsia	Hirota et al. (2012)
WO2012110222-A1	Olanzapina	Tratamento de transtornos psicóticos	Breitenbach et al. (2012)
WO2013028333-A1	Cafeína, Vitaminas E e B	Aumentar energia, aliviar fadiga e melhorar funções do sistema nervoso	Arbit et al. (2013)
	Melatonina, L-theanine, goji berry	Auxiliar no sono	
WO2014070485-A1	Benzocaína	Queimaduras e lesões orais	McDonald et al. (2014)
US20150196558	Aripiprazole	Antipsicótico	Kim e Shin (2015)
US20160184439	Donepezilo	Tratamento de Demência	Kim et al. (2016)
WO2016151461	Cetorolaco de trometamina	Anti-inflamatório	Rudra, Birla e Katakam (2016)
CN105616389A	Desloratadina	Antialérgico	Xianlong et al. (2016)

Fonte: Própria autoria.

Tabela 4 - Exemplo de estudos relacionados com a produção de filmes de desintegração oral com a incorporação de princípios ativos.

Categoria	Polímero	Compostos ativo	Referência
Filmes mucoadesivos *	Gelatina e quitosana	Propanolol	Abruzzo et al., (2012)
Filme de desintegração oral **	Hidroxipropilmetilcelulose e crospovidone	Mesilato de rasagilina	Janßen et al. (2013)
Filme de desintegração oral **	Polivinil álcool e carboximetilcelulose	Clonidina	Buanz et al. (2015)
Filmes mucoadesivos *	Eudragit RL 100, HPMC K15 and carbopol 974P	Nanoesferas com aciclovir	Al-Dhubiab et al. (2015)
Filme de desintegração oral *	Gelatina	Extrato etanólico de propolis	Borges e Carvalho (2015)
Filmes mucoadesivos ***	Hidroxipropilmetilcelulose e PEO N750	Domperidona	Palem et al. (2016)
Filme de desintegração oral *	Maltodextrina, goma karaya e goma de xantano	Succinato de doxilamina	Balakrishna et al. (2016)
Patches *	Quitosana, gelatina	Nanopartículas de insulina	Barzoki et al. (2016)
Filme de desintegração oral *	Metolose®	Omeprazol	Khan et al. (2016)
Filmes mucoadesivos ***	Soluplus® e hidroxipropilmetilcelulose	Cetoconazol	Maniruzzaman et al. (2016)
Filmes mucoadesivos *	Methocel®, Eudragit RL 100®, Ultrez 21® e Pluronic F68®	Glimepirida	Meher et al. (2016)
Filmes mucoadesivos *	Hidroxietilcelulose e goma xantana	Dimenidrinato	Pekoz et al. (2016)
Filmes Mucoadesivos *	Hidroxipropilmetilcelulose, quitosana, hialuronato de sódio, gelatina	Ondansetrone	Transtullo et al. (2016)
Filmes Mucoadesivos *	Carboximetilcelulose e alginato de sódio	Ciprofloxacina	Wu et al. (2016)
Filmes mucoadesivos *	Hidroxipropilmetilcelulose, quitosana, carboximetilcelulose, etilcelulose e carbopol	Fluticasona	Ammar et al (2017)
Filmes de desintegração oral *	Amido e gelatina	Extrato seco de acerola	Garcia et al. (2017)
Filmes de desintegração oral *	Hidroxipropilmetilcelulose e gelatina	Extrato da casca de amendoim	Tedesco et al. (2017)
Filmes mucoadesivos *	Hidroxipropilmetilcelulose, alginato de sódio	Nicotina	Okeke, Boateng (2017)

Fonte: Própria autoria.

Nota: Filmes produzidos por: * casting; ** Tape-casting + impressão; *** extrusão à quente.

Os filmes orais podem ser divididos em 3 categorias, como observa-se na Figura 2: filmes de desintegração oral, filmes mucoadesivo e os adesivos (PREIS et al., 2015). De acordo com Preis et al. (2015) esses filmes se diferem segundo suas propriedades de mucoadesão e liberação do fármaco, conforme mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Propriedades das principais categorias de filmes orais.

Fonte (adaptada): PREIS, M.; BREITKREUTZ, J.; SANDLER, N. Perspective: concepts of printing technologies for oral film formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 494, n. 2, p. 578-584, 2015 (tradução nossa).

Os filmes de desintegração rápida geralmente são produzidos a partir de polímeros solúveis e muito hidrofílicos, apresentam uma liberação instantânea e dissolvem-se em no máximo 60 segundos (KHATOON; RAO; REDDY, 2013). Estes filmes apresentam um inchamento rápido e fácil, sem a necessidade de água, desta forma podem ser facilmente administrados por pessoas com disfagia, enjoo e ânsia de vômito e transtornos mentais (DIXIT PUTHLI, 2009). São aplicados, geralmente, sobre a língua (KHATOON et al., 2013).

Já os filmes mucoadesivos são produzidos principalmente com polímeros hidrofílicos, que intumescem e permitem interações com as moléculas de mucina da mucosa bucal (MORALE; MCCOVILLE, 2011). Apresentam desintegração em poucos minutos, formando um gel, liberando continuamente a droga ao longo do tempo, sendo aplicados, geralmente, na mucosa bucal e na gengiva, aderindo-se a superfície (KHATOON et al., 2013).

Enquanto que os filmes tipo “patches (adesivos)” aderem a mucosa e permanecem ali durante horas liberando o composto ativo (JANI; PATEL, 2015). Ao termino da medicação o filme deve ser removido (JANI; PATEL, 2015). São produzidos geralmente em multicamadas com polímeros insolúveis ou de baixa solubilidade (KHATOON et al., 2013).

Entre as três categorias citadas acima, os filmes mucoadesivos têm sido preferidos, pois garantem uma liberação e ação por um tempo mais prolongado e como ficam aderidos a mucosa bucal ainda evitam a perda de compostos ativos devido ao processo de salivagem e estresse mecânico (REDDY; CHAITANYA; RAO, 2011).

Em relação a produção, diferentes métodos podem ser utilizados, como, por exemplo, por *casting* e extrusão à quente (DIXIT; PUTHLI, 2009). No entanto, um dos grandes desafios para a produção de filmes orais é quando a formulação é ampliada da escala laboratorial para a escala industrial, pois fatores como aquecimento, velocidade de mistura e temperaturas podem acarretar em variação na qualidade do filme (KARKI et al., 2016). Desta forma, é importante avaliar os métodos de produção para garantir a qualidade do produto final e que os compostos ativos não sofram degradação durante o processo.

3.3 Métodos de produção de filmes

Os filmes de desintegração oral são produzidos principalmente pelas técnicas de *casting* ou por extrusão (DIXIT; PUTHLI, 2009).

No método de extrusão todos os ingredientes, incluindo o princípio ativo, são homogeneizados a seco, passam por um processo de aquecimento, para formação de uma massa homogênea e, posteriormente, por moldagem (DIXIT; PUTHLI, 2009). O grande problema da utilização deste método está na degradação de substâncias termosensíveis, devido às altas temperaturas empregadas no processo (DIXIT; PUTHLI, 2009), o que acaba limitando a sua utilização para alguns compostos ativos.

A técnica de *casting* é mais utilizada para a produção de filmes de desintegração oral (DIXIT; PUTHLI, 2009). Nesta técnica os excipientes, polímeros e compostos ativos são dissolvidos em solução aquosa, podendo ser submetidos a agitação e aquecimentos para solubilização (DIXIT; PUTHLI, 2009). A solução obtida passa por um processo de secagem para depois serem cortados no tamanho desejado (BALA et al., 2013, p. 4-5).

Entretanto, a técnica de *casting*, para produção de filmes à base de polímeros naturais, de uma maneira geral, ainda apresenta obstáculos que inviabilizam a produção em larga escala, devido à dificuldade de produzir filmes com dimensões maiores e aos longos tempos de secagem (MORAES et al., 2013).

Como uma alternativa para contornar estes problemas tem crescido o interesse na produção de filmes comestíveis e biodegradáveis utilizando técnica de espalhamento, também conhecida como *tape-casting*. Nesta técnica a suspensão é moldada em uma camada fina sobre o suporte, devido ao movimento de uma lâmina niveladora (MORAES et al., 2013). O espalhamento da solução filmogênica pode ser realizado em suportes maiores ou até mesmo em esteiras transportadoras contínuas (MORAES et al., 2013).

Em todos os métodos citados, vale destacar que o princípio ativo é incorporado na formulação, desta forma, todo o estresse aplicado durante a produção do filme, transporte e estocagem podem afetar a atividade e estabilidade do composto ativo (GENINA et al., 2013a). Buanz et al. (2015) observaram que compostos orgânicos de baixo peso molecular pode provocar um efeito plastificante na matriz polimérica, quando obtidos pelo método de *casting*, o que pode modificar as propriedades mecânicas do material dependendo da quantidade e dos compostos que serão incorporados na matriz.

Recentemente a técnica de impressão tem sido estudada em diferentes trabalhos como uma alternativa para incorporar compostos ativos em filmes de desintegração oral (BUANZ et al., 2011, GENINA et al., 2013a; JANßEN et al., 2013; BUANZ et al., 2015).

No método de impressão é necessária a obtenção de uma matriz polimérica sem princípio ativo, que posteriormente pode ser utilizado como substrato para impressão de solução contendo compostos ativos (PREIS et al., 2015).

No método de impressão o composto é depositado na superfície do substrato com o uso de uma impressora, permitindo que o composto ativo não seja degradado pelo estresse mecânico e térmico provocado durante o processo de produção e secagem dos filmes (GENINA et al., 2013a). Desta forma, podem ser utilizadas temperaturas de secagem ou de produção mais elevadas uma vez que o princípio ativo será incorporado no final do processo.

Pensando em uma fabricação em larga escala, seria necessário apenas uma linha de produção para a confecção do filme base, e o composto ativo poderia ser manipulado e impresso em um espaço menor (JANßEN et al., 2013; BUANZ et al., 2015).

A técnica de impressão pode ser utilizada para produção de matrizes poliméricas com maior precisão de incorporação do composto ativo, podendo a sua concentração ser manipulada alterando a solução de impressão ou aumentando o número de camadas de impressão, desta forma, o material pode ser produzido sob demanda de acordo com a necessidade de cada indivíduo (Figura 3) (BUANZ et al., 2011; PREIS; BREITKREUTZ; SANDLER, 2015).

Figura 3 - Impressão sob demanda para indivíduos com necessidades diferentes de fármacos, sendo que a variação de cores representa soluções de impressão diferentes (por exemplo, com diferentes fármacos).

Fonte (adaptada): PREIS, M.; BREITKREUTZ, J.; SANDLER, N. Perspective: concepts of printing technologies for oral film formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 494, n. 2, p. 578-584, 2015 (tradução nossa).

Devido às características citadas anteriormente, o interesse pela técnica de impressão tem aumentado, pois permite depositar com elevada precisão a proporção desejada de compostos ativos, além de possibilitar a dosagem única ou de múltiplos elementos, dependendo da tecnologia que será utilizada para impressão (PREIS; BREITKREUTZ; SANDLER, 2015).

3.3.1 Métodos de impressão de compostos ativos

Na literatura são reportados principalmente o uso de impressoras jato de tinta (GENINA et al., 2013a; BUANZ et al., 2015) e flexográficas (JANßEN et al., 2013), para impressão de fármacos sintéticos em filmes orais.

As impressoras a jato de tinta podem apresentar três tecnologias de funcionamento: jato de tinta contínuo, térmica (*Bubble jet*) e piezoelétrico (LE, 1998).

No sistema de jato de tinta contínuo (*Continuous Inkjet*) um cristal piezoelétrico produz um fluxo contínuo de milhares de micro gotas que recebem uma carga elétrica dependendo do sinal que recebem (SWEET, 1971). Por conta disso, algumas gotas acabam sendo atraídas pelo papel de impressão e as gotas não aproveitadas entram em um reservatório e são recicladas (LE, 1998) (Figura 4).

Figura 4 - Sistema de impressão jato de tinta contínuo.

Fonte (adaptada): Digital Print Preservation Portal. **Inktej**. Disponível em: <http://www.dp3project.org/technologies/digital-printing/inkjet>. Acessado em 10/02/2017 (tradução nossa).

No sistema térmico (*bubble jet*) o líquido de impressão fica em um reservatório que alimenta pequenos compartimentos da cabeça de impressão (Figura 5.a), que contém um elemento capacitivo, que recebe uma pulsação elétrica, resultando em um aumento rápido de temperatura (Figura 5.b) (LE, 1998). Este aumento de temperatura provoca a vaporização da solução, gerando a expansão de uma bolha de vapor (Figura 5.c) e a medida que a bolha se expande parte da solução é ejetada do compartimento no formato de uma gota (Figura 5.d) (LE, 1998). A bolha de vapor se rompe, eventualmente, gerando vácuo dentro do compartimento que será preenchido com líquido fresco do reservatório (Figura 5.e e 5.f) e este ciclo se repete, de acordo com os pulsos elétricos gerados, produzindo gotas sob demanda (MELÉNDEZ et al., 2008). O resistor pode chegar a uma temperatura de 300°C por alguns microsegundos, entretanto apenas 0,5 % do volume da amostra fica exposto a esta temperatura, pois a bolha é formada e rapidamente se expande em intervalos de tempo entre 3 a 10 μ s (MELÉNDEZ et al., 2008). A maioria dos sistemas de impressão jato de tinta térmica são projetados para a impressão de soluções aquosas, sendo assim, este sistema pode ser mais adequado para impressão de compostos hidrofílicos (BUANZ et al., 2011).

Figura 5 - Esquema de funcionamento de dispositivo jato de tinta térmico: (a) câmara antes da distribuição; (b) microresistor aquece uma fina película da solução de tinta; (c) formação e expansão da bolha; (d) formação da gota; (e) a bolha colapsa e flui solução do reservatório; e (f) a câmara é recarregada.

Fonte (adaptada): MELÉNDEZ, P. A. et al. Thermal inkjet application in the preparation of oral dosage forms: Dispensing of prednisolone solutions and polymorphic characterization by solid-state spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 97, n. 7 p. 2619-2636, 2008 (tradução nossa).

As impressões por jato de tinta com dispositivo piezoelétrico, por outro lado, baseia-se na deformação do cristal piezoelétrico devido à tensão aplicada (GOOLE; AMIGHI, 2016). A gota então é formada devido à deformação desse cristal, como pode ser observado na Figura 6. Neste caso, como não ocorre o aquecimento da solução de impressão, como acontece no jato de tinta térmico, podem ser utilizados uma variedade maior de solventes (GANS; DUINEVELD; SCHUBERT, 2004).

Figura 6 - Esquema da tecnologia Piezoelétrico para impressão.

Fonte (adaptada): Epson. **Secrets Behind the Development of Epson's Micro Piezo Technology (Part 2)**. Disponível em: http://global.epson.com/innovation/topics/201306_03.html. Acessado em 09/02/2017 (tradução nossa).

Na impressão flexográfica, por outro lado, funciona por meio de um método de impressão rotativa direta (GENINA et al., 2012). A impressora flexografica apresenta o rolo cerâmico de anilo que é o responsável por transferir a tinta do reservatório para o cilindro de impressão relevográfico (clichê), que, por sua vez, imprime sobre a superfície desejada (Figura 7) (JANßSEN, et al., 2013). A impressão flexografica tem como vantagem a facilidade de uso e uma maior versatilidade das tintas de impressão (GENINA et al., 2012).

Figura 7 - Esquema da tecnologia flexográfica para impressão.

Fonte (adaptada): JANßSEN, E. M.; SCHLIEPHACKE, R.; BREITENBACH, A.; BREITKREUTZ, J. Drug-printing by flexographic printing technology – A new manufacturing process for oradispersible films. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 441, p. 818-825, 2013 (tradução nossa).

A escolha da técnica de impressão a ser utilizada depende do material sobre o qual será impresso e as características da solução que será utilizada para impressão. As impressoras flexográficas, por exemplo, apresentam maior versatilidade de superfícies que podem ser utilizadas para impressão e de solução para impressão, entretanto, a impressão flexográfica tem baixa precisão de dosagem e cada tinta deve ser impressa separadamente, o que acaba por inviabilizar a produção simultânea de sistemas multicomponentes (GENINA et al., 2012).

Já as impressoras a jato de tinta requerem uma viscosidade e tensão superficial adequados para garantir uma impressão contínua e boa reprodutibilidade das gotas formadas (RIOSIO; YAN, 2007). A impressora jato de tinta possui a vantagem de depositar gotas muito pequenas (5-15 pL) com alta precisão quando comparado com as impressoras flexográficas (BUANZ et al., 2015).

Na literatura é reportado o uso da tecnologia de impressão para a incorporação de compostos ativos em filmes orais, como observado na Tabela 5.

Tabela 5 – Exemplos de filmes de desintegração oral produzidos utilizando-se a técnica de impressão.

Substrato	Composto ativo	Impressora	Técnica de impressão	Referência
Filme de acetato (transparência)	Sulfato de salbutamol	Deskjet D1660 (HP)	Térmica (<i>Bubble jet</i>)	Buanz et al. (2011)
Papel - Dimero de aquil ceteno sem revestimento, com duplo revestimento e com triplo revestimento (Sappin Fine Paper Europe)	Propanolol	Dimatrix DMP-2800 (Fuljifilm)	Piezoelétrico	Genina et al. (2012)
Filme de Polietileno Tereftalato	Riboflavina			
Papel comestível comercial (Sutton Valence)	Loperamida	Dimatrix DMP-2800 (Fuljifilm)	Piezoelétrico	Genina et al., (2013a)
Filme de hidroxipropilcelulose	Cafeína			
Filmes de hidroxipropilmetilcelulose e crospovidone	Mesilato de rasagilina	Pixma MP495 (Canon)	Térmica (<i>Bubble jet</i>)	Genina et al. (2013b)
Filmes de hidroxipropilmetilcelulose e crospovidone	Mesilato de rasagilina	Flexográfica (F.P.100/300, Saueressig)	Flexografia	Janßen et al. (2013)
Filme de polivinil álcool e carboximetilcelulose	Clonidina	Deskjet 460 (HP)	Térmica (<i>Bubble jet</i>)	Buanz et al. (2015)
Folhas de tereftalato de polietileno	Ribonuclease-A	Deskjet 1000 (HP)	Térmica (<i>Bubble jet</i>)	Montenetgro-Nicoline et al. (2017)
	Lisozima			

Fonte: Própria autoria.

Observa-se que até o momento foi avaliada apenas a incorporação de compostos ativos sintéticos em filmes orais com o uso da tecnologia de impressão. Entretanto, os extratos naturais têm sido muito estudados como fontes de compostos ativos. Alguns estudos têm relatado a eficiência dos compostos ativos naturais tanto no extrato, quanto dos compostos isolados do extrato (FOSS et al., 2014; LEMOS, et al., 2015, BENSAD et al., 2017). Desta forma, pode ser interessante avaliar a técnica de impressão para a incorporação de compostos ativos de extratos naturais em matrizes para liberação oral.

3.4 Polímeros para produção de filmes

Os polímeros são utilizados geralmente como excipientes de produtos farmacêuticos, podendo ser naturais, modificados ou até mesmo sintéticos (DIXIT; PUTHLI, 2009). Os polímeros, além de auxiliar na estrutura do material, podem melhorar a estabilidade química, física e microbiológica, biodisponibilidade do princípio ativo e a aceitação do consumidor (LAM et al., 2014).

Dessa forma, a escolha do polímero para a produção do filme oral é extremamente importante, pois eles são os principais responsáveis pelas características, como, por exemplo, a taxa de liberação do fármaco, propriedades mucoadesivas e propriedades mecânicas (KARKI et al., 2016).

Vale destacar que diversos polímeros são estudados atualmente na produção de filmes, na Tabela 6 podem-se observar alguns exemplos. Os polímeros podem ser utilizados em combinação, a fim de atingir uma adequada resistência, flexibilidade, mucoadesividade e solubilidade para desintegração na mucosa oral (BALA et al., 2013).

Tabela 6 – Exemplo de polímeros utilizados na produção de filmes orais.

Polímero	Propriedades	Referência
Amido	Boa propriedade filme-formadora; pode aumentar a biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis; pode ser usado na técnica de extrusão devido à alta temperatura de gelatinização (59-71°C – concentração de 20%); não irritante e não tóxico.	Häusler (2009)
Carboximetilcelulose	Boa propriedade filme formadora; boa capacidade gel-formadora (concentração de 3-6%); elevada mucoadesividade tanto na derme quanto em mucosa; utilizado como estabilizador de emulsão; facilmente disperso em água; não irritante e não tóxico para uso tópico e oral.	Dixit e Puthli (2009) Hooton (2009)
Etilcelulose	Pode ser utilizado para produzir filmes insolúveis; solúvel em solventes orgânicos e misturas; usado para aumentar a estabilidade; mascarar sabor desagradável; não alergênico, não tóxico e não irritante.	Dahl (2009)
Gelatina	Boa capacidade filme-formadora e gel-formadora; apresenta boa mucoadesividade; utilizado para formulações de uso oral e tópico; absorve água entre 5 a 10 vezes o seu peso; Solúvel em água acima de 40 °C; peso molecular 20.000-200.000; não irritante e não tóxico.	Podczec (2009)
Hidropropilmetilcelulose	Boa capacidade filme-formadora; aplicação em formulações farmacêuticas de uso oral, oftálmico, nasal e tópico; apresenta elevada mucoadesividade; utilizado em extrusão à quente; solúvel em água gelada.	Rogers (2009)
Hidropropilcelulose	Boa capacidade filme-formadora; boa solubilidade em água abaixo de 38°C; insolúvel em água quente (40-45°C); apresenta boa mucoadesividade; utilizado em formulações de uso oral e tópico; não irritante e não tóxico.	Kabir (2009)
Polivinil álcool	Boa capacidade filme-formadora; solúvel em água acima de 90°C; peso molecular entre 20.000-200.000; aplicação em formulações de uso oral, oftálmico e tópico; utilizada em formulações de liberação prolongada de uso oral; não irritante e não tóxico.	AbuBacker (2009)
Carragena	Boa capacidade gel-formadora e filme-formadora; solúvel em água à 80°C; utilizado em formulações de uso oral e tópico; não irritante e não tóxico.	Singh (2009)
Quitosana	Boa capacidade filme-formadora; solubilidade parcial em água; solúvel em solvente orgânico ácido; peso molecular entre 10.000-1.000.000; elevada mucoadesividade; utilizado em formulações de uso oral e tópico; não irritante e não tóxico.	Jones (2009)

Fonte: Própria autoria.

Garsuch e Breitzkreutz (2010) avaliaram diferentes tipos de carboximetilcelulose (Walocel C30PA09, C2.000PA07, C2.000PA09 e C40.000PA 09) e hidroxipropilmetilcelulose (HM 6 PA 2910, HM 50 PA 2910 e HM 4.000 PA 2910) para preparação de filmes de desintegração rápida para veicular citrato de cafeína e cafeína anidra. Todas as formulações avaliadas apresentaram tempo de desintegração inferior a 30s, podendo então ser denominados filmes de desintegração rápida, sendo que filmes à base de carboximetilcelulose (C 30 PA 09) contendo citrato de cafeína apresentaram o menor tempo de desintegração (1,42 s para o método de *slide frame* e 1,56 s para o método de disco em placa).

Já Koland, Charyulu e Prabhu (2010) estudaram filmes mucoadesivos à base de etilcelulose ou Eudragit RSPO contendo losartan e avaliaram o efeito do aumento da concentração de hidroxipropilmetilcelulose nas matrizes poliméricas. Os autores observaram que o aumento da concentração de hidroxipropilmetilcelulose provocou aumento no tempo de mucoadesão e na força mucoadesiva.

Prakasam e Bukka (2014) analisaram filmes mucoadesivos à base de hidroxipropilcelulose ou carboximetilcelulose contendo rasagilina e diferentes concentrações de polietilenoglicol sendo que os filmes à base de carboximetilcelulose apresentaram menor tempo de residência, correlacionando com a maior solubilidade deste polímero em relação ao hidroxipropilcelulose, que provocou a erosão e dissolução do filme durante o teste.

El-Enin e Osman (2015) avaliaram filmes de dissolução rápida à base de carboximetilcelulose e hidroxipropilcelulose contendo duas concentrações diferentes (5 e 10%) de superdesintegrantes (croscarmelose sódica e crospovidona) para veicular metoclopramida, sendo observado que a formulação contendo carboximetilcelulose e 10% de crospovidona foi a que apresentou menor tempo de desintegração (13s) e mostrou

permeação satisfatória através da mucosa oral de ovelha (101,95% de fármaco permeado ao fim de 15 minutos).

Tedesco, Monaco-Lourenço e Carvalho (2016) avaliaram filmes de desintegração oral à base de gelatina:hidroxipropilmetilcelulose em diferentes proporções (0:100; 25:75; 50:50; 75:25; 100:0) e observaram que o aumento da concentração de hidroxipropilcelulose provocou redução da hidrofilicidade e do tempo de desintegração e aumento da mucoadesividade.

Vale salientar que na literatura são reportados o uso de filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose e crospovidona (GENINA et al., 2013a; GENINA et al., 2013b) e à base de carboximetilcelulose e polivinil álcool na produção de filmes orais pela técnica de impressão.

Desta forma, a partir das características descritas na literatura, e por já terem sido utilizados para a produção de filmes pela técnica de impressão os polímeros carboximetilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose podem ser uma boa alternativa para a produção de filmes orais.

Contudo, como visto nas Tabelas 3 e 4, ainda são reduzidos os estudos com incorporação de compostos ativos naturais em filmes orais. Além disso, como mostrado na Tabela 5, até o momento não foi reportado na literatura o uso da técnica de impressão para a incorporação de compostos ativos naturais. Entretanto, devido as diversas vantagens apresentadas pela técnica de impressão, em relação a outros métodos de produção, torna-se interessante avaliar a incorporação de compostos naturais por meio de impressão de extratos naturais em filmes orais.

3.5 Compostos ativos naturais

Os compostos ativos naturais de maior interesse na área farmacológica são os compostos fenólicos, os terpenos e os alcaloides (DAI; MUMPER, 2010). Dentre eles, os compostos fenólicos têm sido amplamente estudados em relação a doenças e manutenção da saúde bucal (VARONI et al., 2012).

Umas das razões para esse interesse é que diversos estudos comprovam que os compostos fenólicos apresentam potencial anti-inflamatório (BENSAAD et al., 2017), antitumoral (MANDAL; BISHAYEE; LAM, 2015) e atividade antimicrobiana (WAFA et al., 2017).

Chen et al. (2012) observaram que chá de flores de *Camellia sinensis*, rico em polifenóis, apresentou efetiva ação anti-inflamatória em ensaios com ratos, com redução nos níveis de óxido nítrico, fator de necrose α -tumoral (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1).

Segundo Lolayekar e Shanbhag (2012) a atividade antimicrobiana dos compostos fenólicos é dada pela sua interação com as proteínas da membrana, enzimas e lipídeos, de forma a alterar a permeabilidade da parede microbiana.

Morawiec et al. (2013) analisaram a adição de própolis em pasta de dente e observaram que a mesma foi eficiente na redução de gengivite em pacientes submetidos a cirurgia de transplante dentário.

Além disso, estudos comprovaram também que os compostos fenólicos podem ser utilizados no controle de câncer bucal (VARONI et al., 2012). A capacidade anticarcinogênica dos fenólicos pode estar associada a capacidade de inibir o crescimento do tumor por meio da apoptose das células cancerígenas juntamente com sua capacidade antioxidante (LOLAYEKAR et al., 2012).

Mishra et al. (2017) avaliaram a eficiência de 9 plantas tropicais (*Anogeissus acuminata*, *Azadirachta indica*, *Bauhinia variegata*, *Boerhaavia diffusa*, *Punica granatum*,

Soyimida febrifuga, *Terminalia chebula*, *Tinospora cordifolia* e *Tribulus terrestris*) como antimicrobiano de bactérias multirresistentes isoladas de pacientes com infecção no trato urinário (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os extratos metanólicos das plantas foram ministrados juntamente com os antibióticos comerciais. Os autores observaram que a *Anogeissus acuminata*, *Punica granatum* e *Soyimida febrifuga* foram eficientes no controle destas bactérias.

BenSaad et al. (2017) avaliaram o potencial anti-inflamatório *in vitro* de compostos fenólicos (ácido gálico, ácido elágico e punicaligina A e punicaligina B) isoladas do extrato de *Punica granatum*. Os pesquisadores realizaram a análise em células (macrófagos-RAW264.7) induzidas com lipopolissacarídeos, e observaram que os compostos inibiram a produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE-2) e interleucina 6 (IL-6). Desta forma a romã pode ser uma interessante fonte de compostos ativos.

3.5.1 Romã

A *Punica granatum*, também conhecida como romã, é uma fruta originária da Ásia central (SILVA, 2013). Ela possui aparência globular levemente achatada e pode ser dividida em diferentes partes (Figura 1): o pericarpo, também denominado casca, que apresenta textura lisa de cor castanho-amarelo ao vermelho quando maduro; o mesocarpo (albedo), que possui uma textura esponjosa dividido em vários bolsões, separados por membranas septais, onde ficam armazenados os aglomerados de sementes e as sementes que são envolvidas por arilos (fitotelmo) que consiste na parte comestível do fruto (SILVA, 2013).

Figura 8 - Divisão morfológica da romã.

Fonte: Própria autoria

O extrato das diferentes partes da romã (*Punica granatum* L.) pode apresentar diversas propriedades funcionais como, por exemplo, atividade antimicrobiana (MISHRA et al., 2017), anti-inflamatória (BENSAAD et al., 2017), antioxidante (BEKIR et al., 2013), antitumoral (ZAHIN; AQUIL; AHMAD, 2010), cicatrizante (NAYAK et al., 2013), anti-artrítico (GAUTAM et al., 2013), além de também auxiliar na saúde bucal, reduzindo o desenvolvimento de gengivite (SILVESTRO et al., 2009). Devido a sua alta atividade antioxidante e anti-inflamatória o interesse no potencial nutracêutico e funcional da romã tem crescido (VILADOMIU et al., 2013). Na Tabela 7, pode-se observar alguns estudos e exemplos de possíveis aplicações da romã.

Tabela 7- Estudos para aplicação do extrato de diferentes partes da romã.

Parte	Produto	Utilização	Referência
Casca	Pomada	Feridas dérmicas	Hayouni et al. (2011)
	Comprimido efervescente	Vaginal	Luo et al. (2011)
	Pó	Feridas Dérmicas	Nayak et al. (2013)
	Cápsulas	Dislipidemia	Haghighian et al. (2016)
	Extrato	Antiviral e anti-inflamatório na pele	Houston et al. (2017)
Flor	Enxaguante bucal	Gengivite em pacientes diabéticos	Sedigh-Rahimabadi et al. (2017)
Folha	Micropartículas (murinho)	Asma	Oliveira et al. (2013)
Fruto	Creme	Cuidados com a pele	Akhtar et al. (2012)
	Enxaguante bucal	Sangramento na gengiva	Batista et al. (2014)
Semente	Creme foto protetor	Cuidados com a pele	Kaur e Saraf (2012)
	Nanoemulsão	Protetor solar	Baccarin et al. (2015)
Suco	Embalagens ativa	Antioxidante	Arabestani et al., (2016)

Fonte: Própria autoria.

Seeram et al. (2005) estudaram o efeito antiproliferativo e antioxidante do suco de romã e de compostos isolados da casca de romã (punicalagina, ácido elágico e taninos total) e observaram que o suco de romã apresentou melhor atividade antiproliferativa e maior atividade antioxidante que seus compostos isolados, efeitos estes relacionados com o sinergismos e/ou efeito aditivo dos outros compostos fito químicos presentes no suco de romã.

Já Hayouni et al. (2011) avaliaram a adição de extrato da casca da romã em pomada para feridas dérmicas e observaram que foi eficiente no tratamento das lesões, apresentando propriedades antioxidantes e antimicrobiana, possivelmente associadas a presença dos

elagitaninos (punicalagina A, punicalagina B, ácido gálico e ácido elágico) e antocianinas no extrato.

No estudo de Nayak et al. (2013), os autores verificaram a eficiência de extrato em pó da casca de romã no tratamento de feridas dérmicas em ratos, utilizando o modelo de ferida de excisão e observaram que os animais tratados com o pó tiveram uma cicatrização da ferida mais rápida em relação aos animais com tratamento controle (vaselina) e com tratamento padrão (pomada de mupirocina). Os autores correlacionaram esses resultados à presença de saponinas, triterpenos, taninos, alcaloides e flavonoides no extrato.

Kandemir et al (2013) estudaram o efeito do extrato de semente de romã na cicatrização de feridas na boca causadas por procedimentos cirúrgicos, e verificaram que o extrato apresentou potente poder cicatrizante em modelos experimentais com coelhos.

Sedigh-Rahimabadi et al. (2017) realizaram um teste clínico com 80 pacientes com diabetes mellitus e gengivite e compararam o efeito de enxaguante bucal contendo extrato de flor de romã e enxaguante contendo clorexidina (0,2%). Os autores observaram que o enxaguante bucal contendo extrato de flor de romã apresentou resultados semelhantes ao método de tratamento convencional (clorexidina – 0,2%).

Embora existam resultados promissores, a concentração dos compostos ativos nos extratos de origem natural pode ser influenciada por diversos fatores por se tratar de um produto natural. Dentre esses fatores podemos citar: condições de extração (AMYRGIALAKI et al., 2014), parte da planta (ELFALLEH et al., 2012; ALI et al., 2014), maturidade e região de cultivo (FISCHER et al., 2013; ASADI-GHARNEH; MOHAMMADZAMANI; KARIMI, 2017). Para extração de compostos ativos podem ser utilizados diferentes métodos de extração (KANEIRA; BAPODARA; CHANDA, 2012), assim como diferentes solventes (WANG et al., 2013), temperatura (LIU et al., 2012) e tempo de extração (AMYRGIALAKI et al., 2014).

Kaneria, Bapodara e Chada (2012) avaliaram 3 técnicas de extração (percolação à frio, extrações sucessivas e decocção) e diferentes solventes (éter de petróleo, tolueno, acetato de etila, acetona e água) e observaram variações significativas da atividade antioxidante do extrato em função do método de extração devido ao solvente utilizado.

Wang et al. (2013) avaliaram a otimização de extração de compostos fenólicos de folhas de romã pelo método de extração em soxhlet em relação a diferentes solventes (água, metanol 50%, etanol 50% e acetona 50%), sendo que os melhores resultados foram obtidos para o etanol 50%. Wang et al. (2013) também avaliaram diferentes concentrações do etanol (20, 50 e 75%), temperatura (40, 60 e 80 °C) e tempo (20, 40 e 60 minutos) de extração e reportaram que as condições ótimas de extração pelo método de soxhlet foram: 80°C, etanol 61% e 60 minutos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Reagentes

- Álcool etílico absoluto (Synth)
- Hidroxipropilmetilcelulose (Colorcon)
- Carboximetilcelulose (Denver)
- Glicerina (Synth)
- Folin-Ciocalteu (Sigma – Aldrich)
- Carbonato de sódio anidro (Synth)
- Ácido gálico (Sigma – Aldrich)
- Acetato de potássio (Synth)
- Nitrato de alumínio (Sigma – Aldrich)
- Quercetina (Sigma – Aldrich)
- Fosfato de potássio monofásico (Synth)
- Fosfato de sódio bibásico (Synth)
- Cloreto de sódio (Synth)
- Ácido clorídrico (Synth)
- Bromato de sódio (Synth)

4.1.2 Material

- Frutos e folhas da romãzeira (*Punica granatum* L.) foram coletadas na região de Pirassununga – SP

- Papel comestível comercial à base de fécula da batata (Celebrate-MCM de Souza Importação e Exportação)
- Papel filtro quantitativo (REF:3552, Nalgon)
- Pipeta automática (LabMate Soft)
- Vidrarias (Laborglas, Brasil)

4.1.3 Equipamentos

- Estufa de circulação forçada (Marconi, MA 037, São Paulo, Brasil)
- Estufa (FANEN, 515, São Paulo, Brasil)
- Multiprocessador de alimentos (RI7762/91, Philips Walita, Minas Gerais, Brasil)
- Impressora L375 (Epson, Nagano, Japão)
- Banho termostatzado (Marconi, MA-127, São Paulo, Brasil)
- Texturômetro TA.XT plus (Stable Microsystems SMD, Godalming, Inglaterra)
- Microscópio eletrônico de Varredura (TM-3000, Hitachi, Japão)
- Microscópio de força atômica (Solver Next, NT-MDT, Russia)
- Difrátômetro de raio-x (MiniFlex 600, Rigaku, Japão)
- Rota-evaporador (RV 05, IKA, Estados Unidos)
- Bomba de vácuo (Tecnal, Mod. TE-0581, São Paulo, Brasil)
- Banho ultrassônico (1400A, UltraCleaner)
- Espectrofotômetro Spectrum One (Perkin Elmer, Massachusetts, Estados Unidos)
- Espectrofotômetro (Digimed, São Paulo, Brasil)
- Balança analítica (AY220, Marte, São Paulo, Brasil)
- Incubadora (Shaker MA-420, Marconi, São Paulo, Brasil)
- Agitador mecânico (RW 20 Digital, IKA, Estados Unidos)
- Espalhador (ZAA 2300, Zehntner, Suíça)

- Aplicador Universal de 220 mm de comprimento (ZUA 220, Zehntner, Suíça)

4.2 Etapas realizadas no projeto

O presente trabalho foi dividido em quatro etapas:

- Etapa 1: nesta etapa foram avaliadas diferentes partes da romã (casca, mesocarpo e semente) e a folha da romãzeira, submetidos a diferentes condições de extração. Nesta primeira etapa foi coletado o primeiro lote de romã e folhas. Os extratos foram avaliados em relação a concentração de compostos fenólicos e flavonoides e rendimento de sólidos solúveis totais, sendo que o extrato produzido que apresentou melhor resultado em relação aos parâmetros analisados (concentração de compostos fenólicos, flavonoides e rendimentos de sólidos totais) foi utilizado para a próxima etapa. Desta forma um novo lote de romã foi coletado para execução das outras etapas.
- Etapa 2: avaliação do extrato otimizado para potencial uso como solução de impressão. Foram utilizados extrato sem concentração e com diferentes porcentagens de concentração, com remoção de 10, 20, 30 e 40% (mL/100 mL) do solvente em relação ao extrato não concentrado, com o objetivo de obter um extrato com maior concentração de princípios ativos. Os extratos foram analisados em relação à viscosidade, tensão superficial e concentração de compostos fenólicos.
- Etapa 3: avaliação dos filmes produzidos por *tape-casting* à base de carboximetilcelulose:hidroxipropilcelulose com diferentes proporções (1:0; 1:1; e 0:1) como possível material para uso como substrato no método de impressão, comparando-o com o papel comestível comercial. Nesta etapa,

foram avaliadas as propriedades mecânicas e afinidade do extrato com a matriz (ângulo de contato) dos substratos sem incorporação do princípio ativo.

- Etapa 4: nesta etapa, os filmes foram impressos e avaliados em relação ao conteúdo de água, mucoadesividade, pH de superfície, tempo de desintegração, concentração de compostos fenólicos, liberação *in vitro*, cinética de liberação, espectroscopia de infravermelho, microscopia, difração de raio-x e estabilidade.

4.3 Produção dos extratos

Os frutos e folhas da romãzeira (*Punica granatum* L.) foram adequadamente higienizados conforme metodologia descrita por Cenci (2006), utilizando-se solução de hipoclorito (100 ppm). Após higienização, os frutos foram manualmente separados em três partes distintas: a casca, o mesocarpo e a semente. Todas as partes da romã e as folhas foram secas em estufa de circulação forçada (ausência de luz) à 40°C até massa constante (QU; PAN; MA, 2010). As amostras secas foram trituradas em multiprocessador de alimentos (RI7762/91, Philips Walita) e a granulometria foi padronizada utilizando uma peneira de 40 MESH (abertura de 0,420 mm) e o pó foi armazenado em freezer à -18 °C na ausência de luz até a produção dos extratos.

Os extratos foram produzidos utilizando-se a casca, o mesocarpo, a semente e a folha de romã. Os extratos foram preparados mantendo-se a relação pó:solvente fixa em 1:10 (m/v) e agitação constante (500 rpm), utilizando um agitador mecânico (RW 20 Digital, IKA).

Para cada uma das 4 partes da *P. granatum* (casca, folha, mesocarpo e semente) foram produzidos extratos com diferentes condições de extração, como: temperatura, tempo de extração e concentração de solvente, conforme Tabela 8.

Tabela 8 - Condições de extração utilizadas para a produção de extratos a partir de diferentes partes da *Punica granatum* (casca, folha, mesocarpo e semente): temperatura, tempo de extração e soluções hidroalcoólica com diferentes porcentagens de álcool etílico.

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Concentração de álcool etílico (%)
50	15	50
		70
		90
	30	50
		70
		90
70	15	50
		70
		90
	30	50
		70
		90

Fonte: Própria autoria.

4.4 Caracterização dos extratos

Os extratos hidroalcoólicos foram avaliados em relação ao rendimento de sólidos solúveis totais, concentração de compostos fenólicos e flavonoides. O extrato que foi considerado como tendo os melhores resultados para este conjunto de parâmetros foi caracterizado em relação a viscosidade e tensão superficial, critérios estes que são importantes para o processo de impressão.

4.4.1 Rendimento de sólidos solúveis totais

O rendimento de sólidos solúveis totais (RST) foi determinado pelo método gravimétrico de acordo com a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985). As amostras dos extratos (10 mL) foram submetidas à secagem em estufa (Estufa 515, FANEM) à 105°C até massa constante. O rendimento de sólidos solúveis totais foi calculado utilizando-se a Eq. (1).

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

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

4.4.2 Concentração de compostos fenólicos

A concentração de compostos fenólicos dos extratos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) utilizando-se ácido gálico como padrão. Como reagente foi utilizado o Folin-Ciocalteu diluído em água (1:10; v:v) e carbonato de sódio (7,5%). Os extratos foram devidamente diluídos em álcool etílico 50%. Aliquotas (0,5 mL) das soluções diluídas dos extratos foram adicionadas em um tubo contendo 2,5 mL de Folin-Ciocalteu diluído. Este tubo foi homogeneizado e mantido em repouso por 5 minutos na ausência de luz. Em seguida foram adicionados 2,0 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). A solução foi homogeneizada e mantida em repouso por 2 horas na ausência de luz. A absorbância foi determinada utilizando-se um espectrofotômetro (Digimed) a 740 nm e os valores foram convertidos em mg de ácido gálico/mL de extrato. A curva padrão de ácido gálico foi obtida utilizando-se concentrações entre 0,016 e 0,08 mg de ácido gálico/mL.

4.4.3 Concentração de flavonoides

A concentração de flavonoides foi determinada segundo Park et al. (1995). Os extratos foram diluídos em etanol (80%). A análise foi realizada em duas etapas, a primeira com reação com nitrato de alumínio e a segunda sem nitrato de alumínio. Para a reação com nitrato de alumínio alíquotas (0,5 mL) do extrato diluído foram adicionadas em 4,3 mL de etanol 80%, 0,1 mL de nitrato de alumínio (10%) e 0,1 mL

de acetato de potássio (1 mol/L). Já na reação sem nitrato de alumínio alíquotas (0,5 mL) do extrato diluído foram adicionadas em 4,4 mL de etanol 80% e 0,1 mL de acetato de potássio (1 mol/L). O branco foi preparado com 4,9 mL de álcool etílico (80%) e 0,1 mL de acetato de potássio (1 mol/L). As soluções foram mantidas em repouso (40 minutos) na ausência de luz. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro (Digimed) à 415 nm. A absorbância final das amostras foi calculada a partir da variação entre a reação com e sem nitrato, conforme a Eq. 2. Os valores foram expressos em mg eq. quercetina/mL extrato, utilizando-se curva padrão de quercetina preparada com concentrações entre 0,06 e 0,16 mg de quercetina/mL.

$$ABS_{Final} = ABS_{Com} - ABS_{Sem} \quad (2)$$

Onde: ABS_{Final} = absorbância final; ABS_{Com} = absorbância da reação com nitrato; ABS_{Sem} = absorbância da reação sem nitrato.

4.5 Caracterização do extrato para impressão

O extrato que apresentou maior concentração de compostos fenólicos, flavonoides e rendimentos de sólidos totais foi concentrado utilizando-se um rotaevaporador e caracterizado em relação à viscosidade, tensão superficial e concentração de compostos fenólicos.

4.5.1 Concentração em rotaevaporador

Com o objetivo de obter soluções com maior concentração de compostos fenólicos, o extrato do mesocarpo da romã foi submetido à evaporação de solvente sob baixa pressão em rotaevaporador (RV 05, IKA). Os extratos foram concentrados à 40°C, sob vácuo (-650 mm Hg) em diferentes porcentagens de evaporação do solvente

conforme apresentado na Tabela 9. Os extratos concentrados foram caracterizados em relação a viscosidade, tensão superficial e concentração de compostos fenólicos.

Tabela 9 – Porcentagem de concentração dos extratos obtidos do mesocarpo de romã utilizando-se um rotaevaporador.

Porcentagem de concentração (%)	Volume inicial de extrato (mL)	Volume de solvente removido (mL)	Volume final de extrato (mL)
0	100	0	100
10	100	10	90
20	100	20	80
30	100	30	70
40	100	40	60

Fonte: Própria autoria.

4.5.2 Viscosidade

As análises de viscosidade foram realizadas utilizando-se viscosímetro rotativo com geometria de cilindro Stabinger Viscometer SVM 3000 (Anton Paar). A análise foi realizada à 25°C em triplicata. Para análise, foram utilizados 2,5 mL da amostra e os dados de viscosidade dinâmica e viscosidade cinemática solução foram obtidos diretamente do equipamento.

4.5.3 Tensão superficial

A tensão superficial foi determinada utilizando-se o método do anel em um tensiômetro (Attension Sigma Force) com o probe (Du Noüy ring) adequado do equipamento. A tensão superficial (média de 5 leituras) foi obtida pela correção matemática de Hud-Mason, pelo próprio equipamento utilizando-se amostras de 15mL do extrato. A análise foi realizada à 25±0,5 °C, em triplicata.

4.5.4 Concentração de compostos fenólicos dos extratos concentrados

A concentração de compostos fenólicos dos extratos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) utilizando-se ácido gálico como padrão, conforme descrito no item 4.4.2.

4.6 Produção dos filmes orais por tape-casting

Os filmes foram produzidos pela técnica de *tape-casting* utilizando um espalhador ZAA 2300 (Zehntner) com o auxílio do aplicador universal de 220 mm de comprimento (ZUA 220). Para a produção dos filmes, foram utilizadas como macromoléculas carboximetilcelulose (CMC) e hidroxipropilmetilcelulose (HPMC). Foram avaliadas diferentes concentrações de macromoléculas conforme observado na Tabela 10. A concentração de plastificante foi mantida constante em 20 g de glicerol/100 g de macromolécula. As espessuras foram determinadas em testes preliminares de forma a garantir uma mesma espessura final após a secagem.

Tabela 10 - Formulações dos filmes orais em relação a massa de carboximetilcelulose (m_{CMC}), massa de hidroxipropilmetilcelulose (m_{HPMC}) e altura do espalhador.

Formulação	m_{CMC} (g)	m_{HPMC} (g)	Altura (μm)
CMC	4	0	3000
Blenda	3	3	2000
HPMC	0	10	1200

Fonte: Própria autoria.

Para a produção dos filmes, as macromoléculas foram hidratadas em água destilada por 1 hora à temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$) e depois solubilizadas em banho termostaticado (80°C , MA-420) por 30 min. Após este período, o plastificante, previamente solubilizado, foi adicionado e a solução foi mantida à 80°C (10min, banho

termostratizado). A solução filmogênica foi mantida sob vácuo por 12 horas para remoção de bolhas. Essa solução foi espalhada em placas de vidro utilizando-se o espalhador (ZAA 2300), sendo que a velocidade foi mantida constante em 25 mm/s. Para manter a espessura constante dos filmes após secagem, a altura do aplicador universal (ZUA 220) foi ajustada conforme Tabela 10.

4.7 Caracterização dos filmes livres de compostos ativos

Os filmes à base de carboximetilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose foram avaliados em relação à propriedade mecânica e ângulo de contato. Os filmes foram comparados com um papel comestível comercial, à base de fécula de batata, utilizado para impressão.

4.7.1 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas (tensão na ruptura, alongação e módulo elástico) foram determinadas pelo teste de tração, utilizando-se o texturômetro TA.XT Plus (Stable Microsystems SMD) de acordo com a metodologia ASTM (D822-10). Amostras de filmes (25 mm) foram fixadas em probe específico, sendo a distância inicial de separação fixada em 100 mm e a velocidade do teste em 50 mm/min para os filmes a base de carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e blenda.

O papel comestível comercial apresentou alongação inferior a 20%. Desta forma, a distância inicial de separação foi fixada em 125 mm e a velocidade de 12,5 mm/min de acordo com a norma da ASTM (D822-10).

As amostras foram tracionadas até a ruptura, gerando uma curva de tensão (MPa) versus deformação (%). Utilizando-se o software do equipamento (Exponent), os valores de tensão de ruptura (TR) e alongação (E), foram obtidos diretamente da curva

de tensão versus deformação e o módulo elástico (ME) foi determinado na parte linear na curva pelo cálculo do coeficiente angular. A análise foi realizada em triplicata com 10 repetições.

4.7.2 Ângulo de contato

O ângulo de contato (Θ) entre o extrato e o substrato (papel comestível comercial, filme à base de carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e blenda dos dois polímeros) foi determinado pelo método da gota, utilizando um tensiômetro ótico (Attension, Theta Lite Optical Tensiometer). Amostras do substrato (2 x 2 cm²) foram fixadas na base do equipamento e uma gota (3,5±0,5 µL) do extrato foi depositada na superfície do substrato. O ângulo de contato foi determinado através da média dos ângulos direito e esquerdo, utilizando o software do equipamento (Attensio Theta). O ângulo de contato foi determinado nos tempos 0; 0,5; 1; 2 e 10 segundos.

4.8 Produção dos filmes impressos

Para a impressão dos filmes foi utilizado uma impressora tanque de tinta L375 (Epson). Os tanques laterais da impressora (Figura 9) foram preenchidos com o extrato hidroalcoólico obtidos do mesocarpo da romã. Para a impressão das matrizes poliméricas, foram gerados quadrados pretos no programa Microsoft Word 2013, nas dimensões 2x2 cm², 3x3 cm² e 4x4 cm², sendo a impressão realizada na configuração “Premium Photo Paper Glossy” em alta qualidade, utilizando a opção de cor Preto/Tons de cinza (Figura 10). Os substratos foram submetidos a impressão consecutivas (de 1 à 4 camadas) com um intervalo de 10 minutos entre cada camada.

Figura 9 - Impressora Epson L375 com tanque de tinta lateral.

Fonte: Própria autoria.

Figura 10 - Janela de propriedades de impressão da Epson L375 da ferramenta de impressão do programa Microsoft Word 2013.

Fonte: Própria autoria.

4.9 Caraterização dos filmes impressos

4.9.1 Conteúdo de água

O conteúdo de água dos filmes foi determinado segundo AOAC (2005). Amostras de filmes foram submetidas à secagem em estufa (105°C) até massa constante. O conteúdo de umidade foi determinado conforme a Eq. (3)

$$CA = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100 \quad (3)$$

Onde: CA = conteúdo de água dos filmes (g de H₂O/100g de filme); m_i = massa inicial da amostra (g); e m_f = massa final da amostra (g).

4.9.2 Cor

Os substratos impressos foram avaliados em relação aos parâmetros de cor utilizando-se um colorímetro Miniscan XE (HunterLab). Os parâmetros de cor foram determinados pelo software do equipamento – *Universal software* (HunterLab Associates Laboratory) 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 leitura foi coletada em 10 pontos de cada amostra em triplicata.

4.9.3 pH de superfície

O pH de superfície dos filmes foi determinado de acordo com Manhar et al. (2013). A amostra de filme foi colocada em copo béquer contendo 15 mL de solução

tampão fosfato salino (pH 6,8). O pH da solução foi registrado nos tempos de 15, 30 e 60 minutos de contato com as amostras. A análise foi realizada em triplicata.

4.9.4 Microscopia eletrônica de varredura

A microestrutura da superfície dos filmes foi observada em microscópio eletrônico de varredura (TM-3000, Hitachi). As amostras foram fixadas no suporte do equipamento com fita dupla face de cobre condutor. Foram utilizados aumento de 500x e 2.000x para os substratos papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilcelulose, respectivamente.

4.9.5 Microscopia de força atômica

A microscopia foi realizada em um microscópio de força atômica (Solver Next, NT-MDT), de acordo com Bonilla et al. (2013). Amostras dos filmes (1 cm²) foram fixadas no aparelho e três imagens tridimensionais da superfície do filme foram coletadas. As imagens foram analisadas utilizando o programa Image Analysis 3.1.0.0.

4.9.6 Tempo de desintegração

O tempo de desintegração foi determinado segundo metodologia descrita por Garsuch et al. (2010). As amostras de filmes (20 x 30 mm) foram fixadas em um suporte (*slide frame*) e uma gota de água destilada (200µL) foi depositada sobre o filme. O tempo necessário para formar um furo no filme foi fixado como sendo o tempo de desintegração. A análise foi realizada em triplicata.

4.9.7 Concentração dos compostos fenólicos

Amostras de filme (2,54x5,08 cm²) foram imersas em solução hidroalcóolica (20 mL de álcool etílico 50%) para extração dos compostos fenólicos. As soluções contendo os filmes foram mantidas sob agitação (100 rpm) e temperatura (25°C) constantes por 12 horas em mesa agitadora (Shaker MA-420). Após este período, as amostras foram diluídas para análise. A concentração de compostos fenólicos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), como descrito no item 4.4.2.

4.9.8 Liberação *in vitro*

A liberação *in vitro* foi realizada de acordo com Perumal et al. (2008). As amostras de filmes de desintegração oral (2,5 x 2,5 cm) foram imersas em solução tampão fosfato salino (pH 6,8) à 37°C e mantidas sob agitação à 100 rpm em mesa agitadora (Shaker MA-420). Alíquotas (0,1mL) foram retiradas em diferentes tempos (0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40; 60; 80; 100; 120 e 140 minutos). Para manter o volume constante durante a análise, o sistema foi realimentado com solução tampão (volume igual ao retirado) no mesmo tempo em que as alíquotas foram retiradas. A concentração de compostos fenólicos foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). A análise foi realizada em triplicata.

4.9.9 Cinética de liberação

A cinética de liberação dos compostos fenólicos foi avaliada utilizando-se os modelos matemáticos apresentados na Tabela 11. O programa computacional Statistica (Versão 11) foi utilizado para a determinação das constantes dos modelos.

Tabela 11 - Modelos matemáticos utilizados na avaliação dos mecanismos da cinética de liberação dos compostos fenólicos em filmes de desintegração oral.

Modelos de liberação	Equações	Referência
Ordem zero	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_0 t + b$	Varelas, Dixon e Steiner (1995)
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_H \sqrt{t} + b$	Higuchi (1961)
Peppas e Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = K_1 t^m + K_2 t^{2m}$	Peppas e Sahlin (1989)
Korsmeyer e Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n + b$	Korsmeyer e Peppas (1981)

Fonte: Própria autoria.

Onde: (M_t/M_∞) = fração de fármaco liberada ao longo do tempo (t, minutos); (b) = concentração inicial de fármaco na solução; $(K_0, K_H$ e $K)$ = constante cinética; (n) = expoente de liberação do fármaco; (K_1) = Constante relativa do mecanismo de difusão Fickiana; (K_2) = constante relativa do mecanismo de erosão/relaxamento (transporte Caso II); (m) = expoente de difusão Fickiana.

Na avaliação do perfil de liberação foram determinados os fatores de diferença (f_1) e de similaridade (f_2) conforme Eq. 4 e 5, respetivamente (FDA, 1997).

$$f1 = \{ \sum_{t=1}^n |R_t - T_t| / \sum_{t=1}^n R_t \} 100 \quad (4)$$

$$f2 = 50 \log \{ [1 + 1/n \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2]^{-0,5} 100 \} \quad (5)$$

Onde: f_1 = fator de semelhança; f_2 = fator de diferença; R_t = quantidade de fármaco liberado na amostra referência no tempo t; T_t = quantidade de fármaco liberado na amostra teste no tempo t; n = número de pontos; t = tempo.

4.9.10 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A análise foi realizada segundo Maheswari et al. (2014) utilizando-se espectrômetro Perkin Elmer (Spectrum One FT-IR). As varreduras (16 por amostra) foram realizadas na faixa espectral de 650 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.9.11 Difração de raio-x

A cristalinidade dos filmes foi avaliada utilizando um difratômetro MiniFlex 600 (Rigaku) equipado com uma fonte pontual de radiação Cu-K α operando a 40 kV e 15mA. As varreduras foram realizadas de 5° a 50° (2 θ), a uma taxa de 1°/min, como passo de 0,02°.

4.9.12 Análise de estabilidade

Os filmes foram armazenados em dessecadores à temperatura ambiente (25 $\pm$ 5°C) contendo solução salina saturada de brometo de sódio (umidade relativa = 58%). Os filmes foram avaliados em relação à concentração de compostos fenólicos por um período de 196 dias.

4.10 Análise estatística

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos extratos

5.1.1 Rendimento de sólidos solúveis totais

Os rendimentos de sólidos totais dos extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das diferentes partes da romã podem ser observados na Tabela 12. Para o mesocarpo, na temperatura de 70 °C utilizando-se etanol 50 %, tanto para o tempo de 15 como para 30 minutos não foram quantificados o rendimento de sólidos solúveis totais, devido a gelificação da solução de extração após as 24h de armazenamento (Figura 11).

Tabela 12 - Rendimento de sólidos solúveis totais de extratos obtidos da casca, folha, mesocarpo e semente de romã em função da temperatura de extração (T), tempo de extração (t) e soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações de álcool etílico (C_{etanol}).

T (°C)	t (min)	C_{etanol} (%)	RST (%)			
			Casca	Folha	Mesocarpo	Semente
50	15	50	4,52 ± 0,10 ^{bc,B}	4,27 ± 0,10 ^{bc,C}	5,88 ± 0,15 ^{c,A}	1,57 ± 0,03 ^{c,d,D}
		70	4,30 ± 0,05 ^{d,B}	4,13 ± 0,08 ^{c,C}	5,72 ± 0,08 ^{d,A}	1,50 ± 0,04 ^{e,d,D}
		90	3,38 ± 0,05 ^{g,B}	2,44 ± 0,02 ^{g,C}	3,73 ± 0,13 ^{g,A}	1,22 ± 0,01 ^{g,D}
	30	50	4,64 ± 0,10 ^{ab,B}	4,35 ± 0,08 ^{b,C}	5,90 ± 0,06 ^{c,A}	1,84 ± 0,05 ^{a,D}
		70	4,41 ± 0,06 ^{cd,B}	4,32 ± 0,09 ^{b,B}	5,79 ± 0,13 ^{cd,A}	1,58 ± 0,03 ^{bcd,C}
		90	3,46 ± 0,10 ^{fg,B}	2,70 ± 0,13 ^{f,C}	4,04 ± 0,05 ^{f,A}	1,34 ± 0,09 ^{f,D}
70	15	50	4,82 ± 0,28 ^{a,B}	4,64 ± 0,27 ^{a,C}	ND	1,67 ± 0,10 ^{bc,D}
		70	4,66 ± 0,04 ^{ab,B}	4,64 ± 0,34 ^{a,B}	6,15 ± 0,15 ^{b,A}	1,51 ± 0,07 ^{d,C}
		90	3,64 ± 0,07 ^{f,B}	3,06 ± 0,02 ^{e,C}	4,10 ± 0,03 ^{f,A}	1,29 ± 0,10 ^{fg,D}
	30	50	4,65 ± 0,43 ^{ab,B}	4,59 ± 0,08 ^{a,C}	ND	1,69 ± 0,06 ^{b,D}
		70	4,71 ± 0,30 ^{ab,B}	4,67 ± 0,04 ^{a,B}	6,45 ± 0,10 ^{a,A}	1,60 ± 0,02 ^{bcd,C}
		90	3,99 ± 0,09 ^{e,B}	3,65 ± 0,07 ^{d,C}	4,58 ± 0,09 ^{e,A}	1,39 ± 0,02 ^{ef,D}

ND – não determinado, extrato solidificado.

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as medias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Figura 11 - Extratos solidificados do mesocarpo de romã obtidos utilizando-se como solvente álcool etílico 50%, temperatura de extração igual à 70°C e diferentes tempos de extração: (a) 15 minutos e (b) 30 minutos.

Fonte: Própria autoria.

Observou-se diferença significativa entre os resultados das partes da romã avaliadas, sendo que o mesocarpo apresentou o maior rendimento de sólidos solúveis totais, seguido da casca, folha e semente (Tabela 12), considerando os mesmos parâmetros de extração. De maneira geral, para todas as partes, foi observada redução significativa do rendimento de sólidos solúveis totais com o aumento da concentração de etanol e aumento significativo com o aumento da temperatura e do tempo de extração. O maior rendimento foi observado para o extrato obtido do mesocarpo utilizando a temperatura de 70°C, álcool etílico 70% e com tempo de extração de 30 min.

5.1.2 Concentração de compostos fenólicos

Na Tabela 13, pode-se observar as concentrações de compostos fenólicos para os extratos hidroalcoólicos obtidos a partir das diferentes partes da romã. Observou-se que os extratos obtidos utilizando-se solução hidroalcoólica 90% de álcool etílico apresentaram menor concentração de compostos fenólicos em comparação com as soluções de 70 e 50%.

Observou-se diferença significativa entre as partes da romã avaliadas, sendo que o mesocarpo apresentou a maior concentração de compostos fenólicos seguido da casca, folha e semente. Foi observado que o aumento da temperatura e do tempo de extração provocaram aumento significativo da concentração de compostos fenólicos (Tabela 13).

Tabela 13 - Concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{fenólicos}}$) dos extratos obtidos da casca, folha, mesocarpo e semente de romã em função da temperatura de extração (T), tempo de extração (t) e soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações de álcool etílico (C_{etanol}).

T (°C)	t (min)	C_{etanol} (%)	$C_{\text{fenólicos}}$ (mg de ácido gálico /mL de extrato)			
			Casca	Folha	Mesocarpo	Semente
50	15	50	27,6 ± 0,8 ^{cd,B}	23,4 ± 0,6 ^{e,C}	30,3 ± 0,8 ^{b,A}	0,50 ± 0,02 ^{bc,D}
		70	27,0 ± 1,2 ^{d,B}	22,9 ± 0,2 ^{e,C}	28,8 ± 0,9 ^{b,A}	0,42 ± 0,02 ^{d,D}
		90	18,8 ± 0,8 ^{f,B}	11,6 ± 0,1 ^{i,C}	17,1 ± 0,7 ^{e,A}	0,24 ± 0,01 ^{f,D}
	30	50	28,5 ± 0,3 ^{bc,B}	25,2 ± 0,9 ^{bcd,C}	32,4 ± 0,7 ^{a,A}	0,62 ± 0,03 ^{a,D}
		70	27,7 ± 0,8 ^{cd,B}	24,4 ± 1,3 ^{d,C}	32,8 ± 1,4 ^{a,A}	0,47 ± 0,01 ^{c,D}
		90	19,9 ± 0,3 ^{f,A}	13,0 ± 0,5 ^{h,B}	19,3 ± 0,7 ^{d,A}	0,26 ± 0,01 ^{f,C}
	15	50	29,3 ± 1,7 ^{ab,B}	25,8 ± 1,1 ^{bc,C}	ND	0,60 ± 0,04 ^{a,D}
		70	28,7 ± 1,6 ^{bc,B}	25,0 ± 0,3 ^{cd,C}	32,4 ± 1,1 ^{a,A}	0,46 ± 0,02 ^{c,D}
		90	19,6 ± 0,6 ^{f,B}	15,3 ± 0,4 ^{g,C}	18,8 ± 0,7 ^{d,A}	0,50 ± 0,03 ^{ef,D}
70	30	50	29,2 ± 1,3 ^{ab,B}	26,0 ± 0,5 ^{b,C}	ND	0,60 ± 0,01 ^{a,D}
		70	29,9 ± 1,2 ^{a,B}	27,6 ± 1,2 ^{a,C}	32,6 ± 1,4 ^{a,A}	0,53 ± 0,02 ^{b,D}
		90	21,8 ± 0,8 ^{e,A}	17,9 ± 0,6 ^{f,B}	21,8 ± 1,0 ^{c,A}	0,31 ± 0,03 ^{e,C}

ND – não determinado, extrato solidificado.

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as medias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria

Os resultados observados corroboram com os observados na literatura. Fischer, Carle e Kammerer (2011) avaliaram a concentração de compostos fenólicos em extratos obtidos a partir da casca e do mesocarpo de romã, utilizando metanol (80% v/v; 0,1% de HCl) como solvente e observaram maior concentração nos extratos produzidos a partir do mesocarpo.

Gözklekçi et al. (2011) avaliaram a concentração de compostos fenólicos em suco de romã e extrato da casca e semente (solvente: etanol 50%) e observaram que o suco e o extrato da semente de romã apresentaram a menor concentração de compostos fenólicos em relação ao suco de romã.

Ali et al. (2014) avaliaram diferentes partes da romã (casca, mesocarpo e semente) utilizando metanol e acetato de etila como solvente de extração e observaram que o mesocarpo e casca apresentaram concentração de compostos fenólicos e flavonoides superiores aos extratos obtidos a partir da semente. Além disso, Ali et al. (2014) verificaram que os extratos produzidos utilizando-se o metanol como solvente apresentaram maior concentração de fenólicos em relação ao acetato de etila, e os autores relacionaram o aumento da concentração com o aumento da polaridade do solvente.

5.1.3 Concentração de flavonoides

Na Tabela 14 pode se observar os resultados referentes à concentração de flavonoides dos extratos produzidos utilizando-se diferentes partes da romã. Não foi possível quantificar a concentração de flavonóides nos extratos obtidos a partir das sementes de romã pois as concentrações nestes extratos, possivelmente, foram inferiores ao valor mínimo detectado pelo método.

Em relação a concentração de flavonoides (Tabela 14), observou-se variações significativas entre as diferentes partes da romã considerando os mesmos parâmetros de extração, sendo que o mesocarpo apresentou maior concentração de flavonóides, seguido da casca e folha.

Já a respeito da concentração do álcool etílico nas soluções hidroalcoólicas utilizadas nas extrações, foi observado que os extratos obtidos com concentrações de etanol iguais a 50 e 70% apresentaram concentração significativamente superior de flavonoides quando comparados com os extratos das diferentes partes da romã obtidos utilizando-se soluções com concentração de álcool etílico igual a 90%. Em relação ao

aumento da temperatura e do tempo de extração não foram observadas variações significativas para a maioria dos tratamentos.

Tabela 14 - Concentração de flavonoides ($C_{\text{Flavonoides}}$) dos extratos obtidos da casca, folha, mesocarpo e semente de romã em função da temperatura de extração (T), tempo de extração (t) e soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações de álcool etílico C_{etanol} (%).

T (°C)	t (min)	C_{etanol} (%)	$C_{\text{Flavonoides}}$ (mg de quercetina/mL de extrato)		
			Casca	Folha	Mesocarpo
50	15	50	$3,1 \pm 0,5^{ab,B}$	$1,04 \pm 0,06^{ab,C}$	$4,7 \pm 0,9^{abc,A}$
		70	$3,1 \pm 0,2^{ab,B}$	$0,94 \pm 0,06^{c,C}$	$4,4 \pm 0,7^{c,A}$
		90	$2,0 \pm 0,1^{d,B}$	$0,43 \pm 0,04^{d,C}$	$2,4 \pm 0,5^{d,A}$
	30	50	$3,0 \pm 0,1^{ab,B}$	$0,90 \pm 0,06^{c,C}$	$4,8 \pm 0,8^{abc,A}$
		70	$2,8 \pm 0,1^{bc,B}$	$0,98 \pm 0,09^{abc,C}$	$4,6 \pm 0,9^{bc,A}$
		90	$2,0 \pm 0,2^{d,A}$	$0,49 \pm 0,04^{d,B}$	$2,5 \pm 0,5^{d,A}$
70	15	50	$2,6 \pm 0,6^{c,A}$	$0,94 \pm 0,08^{c,B}$	ND
		70	$2,9 \pm 0,5^{bc,B}$	$0,96 \pm 0,08^{bc,C}$	$5,1 \pm 0,6^{ab,A}$
		90	$1,9 \pm 0,2^{d,B}$	$0,51 \pm 0,06^{d,C}$	$2,7 \pm 0,5^{d,A}$
	30	50	$3,2 \pm 0,6^{ab,A}$	$1,07 \pm 0,09^{a,B}$	ND
		70	$3,4 \pm 0,4^{a,B}$	$1,05 \pm 0,08^{ab,C}$	$5,3 \pm 1,0^{a,A}$
		90	$2,1 \pm 0,3^{d,B}$	$0,49 \pm 0,06^{d,C}$	$2,9 \pm 0,4^{d,A}$

ND – não determinado, extrato solidificado.

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna e letras maiúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as medias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria

Huang et al. (2017) avaliaram diferentes soluções hidroalcoólicas (concentrações de etanol 40, 50, 60, 70 e 80%) para extração de flavonoides da casca de romã e observaram aumento da concentração de flavonoides com o aumento da concentração de etanol até 60% na solução hidroalcoólica, após esta concentração de etanol os autores observaram redução da concentração de flavonoides. Desta forma os autores reportaram a utilização do etanol 60% como sendo o ideal para a extração de flavonoides.

5.2 Caracterização do extrato para impressão

Com base nos resultados observados no item anterior, observou-se que o extrato que apresentou maior rendimento de sólidos solúveis totais, concentração de compostos fenólicos e flavonoides foi o extrato obtido a partir do mesocarpo de romã, com temperatura e tempo de extração iguais a 70°C e 30 minutos, respectivamente.

Desta forma, este extrato foi caracterizado em relação a viscosidade e tensão superficial, com o objetivo de avaliar a possibilidade do uso deste extrato como solução de impressão. Adicionalmente, o extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã foi concentrado em rotaevaporador para obter soluções com maior concentração de compostos fenólicos.

5.2.1 Viscosidade

Os valores de viscosidade dinâmica e cinemática dos extratos hidroalcoólicos utilizando-se o do mesocarpo de romã, com e sem concentração, podem ser observados na Tabela 15. Observou-se que os extratos mais concentrados apresentaram maior viscosidades dinâmica e cinemática, em função da eliminação do solvente.

A viscosidade e a tensão superficial são propriedades importantes para uma solução de impressão. A solução de impressão deve conter valores adequados de viscosidade e tensão superficial para garantir o fluxo contínuo e boa reprodutibilidade da formação de gotas (RISIO, YAN, 2007). Soluções com baixa viscosidade podem escorrer pela cabeça de impressão, enquanto soluções muito viscosas e de alta tensão superficial não conseguem passar (SANDLER et al., 2011).

Tabela 15 - Viscosidade dinâmica (τ) e viscosidade cinemática (ν) dos extratos hidroalcoólicos obtido do mesocarpo de romã sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração.

Porcentagem de concentração (%)	τ (mPa.s)	ν (mm ² /s)
0	2,73±0,02 ^a	3,01±0,01 ^a
10	2,91±0,01 ^b	3,15±0,01 ^b
20	3,02±0,03 ^c	3,24±0,03 ^c
30	3,18±0,02 ^d	3,36±0,02 ^d
40	3,35±0,03 ^e	3,49±0,03 ^e

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Genina et al. (2012) avaliaram solução com propranolol (30:70, polietilenoglicol:água) e riboflavina (10:10:80, glicerol:etanol:água) e reportaram viscosidade dinâmica de 2,7 e 1,6 mPa.s, respectivamente, e observaram boa uniformidade dos fármacos nos filmes impressos

Genina et al. (2013a) observaram para solução de impressão contendo loperamina (40:60, polietilenoglicol:água) e cafeína (30:70, polietilenoglicol:etanol) viscosidade dinâmica de 3,6 e 2,6 mPa.s, respectivamente.

5.2.2 Tensão superficial

Na Tabela 15 podem ser observados os valores de tensão superficial do extrato sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração. Observou-se variações significativas entre os extratos, porém não foi possível fazer uma correlação com o aumento da concentração dos extratos. De maneira geral, o extrato sem concentração e os extratos com diferentes porcentagens de concentração apresentaram valores de tensão superficial próximos aos reportados na literatura para impressora com tecnologia piezoelétrica.

Genina et al. (2013a) avaliaram soluções de impressão contendo loperamida e cafeína e observaram tensão superficial de 25,7 e 50,7 nM.m^{-1} , respectivamente. Os autores observaram que a solução de loperamida apresentou uma tensão superficial mais adequada para impressão, pois os filmes impressos com loperamina apresentaram concentração experimental mais próxima à concentração teórica quando comparado com os filmes impressos com a solução de cafeína.

Desta forma, os extratos hidroalcoólicos obtidos do mesocarpo de romã, tanto puro, quanto com diferentes porcentagens de concentração podem ser utilizados como solução de impressão.

Tabela 16 - Tensão superficial dos extratos hidroalcoólico do mesocarpo de romã sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração.

Porcentagem de concentração (%)	Tensão superficial (mN/m)
0	27,2 $\pm$ 0,3 ^b
10	27,8 $\pm$ 0,1 ^a
20	27,3 $\pm$ 0,3 ^b
30	26,9 $\pm$ 0,1 ^b
40	26,4 $\pm$ 0,2 ^c

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as medias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

5.2.3 Concentração de compostos fenólicos

O aumento da concentração do extrato provocou aumento da concentração de compostos de compostos fenólicos (Tabela 16), como esperado. Verificou-se ainda, que o aumento da porcentagem de concentração provocou aumento linear ($R^2 = 0,9416$) da concentração de compostos fenólicos no extrato produzido a partir do mesocarpo de romã, conforme observado na Eq. 4.

$$C_{\text{Fenólicos}} = 4,227 * (\text{Porcentagem de concentração do extrato}) + 28,09 \quad (4)$$

Estes resultados eram esperados, uma vez que o solvente é removido durante a rotaevaporação dos extratos utilizando-se baixa temperatura (40°C/vácuo). Desta forma, não houve degradação dos compostos fenólicos devido ao processo de rotaevaporação.

Tabela 17 - Concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{Fenólicos}}$) dos extratos hidroalcoólico do mesocarpo de romã sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração.

Porcentagem de concentração (%)	$C_{\text{Fenólicos}}$ (mg de ác. gálico/mL)
0	33,0±0,5 ^a
10	37,0±1,8 ^b
20	39,9±0,5 ^c
30	42,7±0,8 ^d
40	51,3±1,2 ^e

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria

Como os extratos avaliados, com e sem concentração, apresentaram viscosidade e tensão superficial semelhante aos valores reportados na literatura para solução de impressão em impressora tipo piezoelétrica, podemos inferir que os extratos hidroalcoólicos obtidos do mesocarpo de romã podem ser utilizados para impressão. Adicionalmente, como o extrato com porcentagem de concentração igual a 40% apresentou maior concentração de compostos fenólicos, esse foi selecionado para a produção dos filmes.

5.3 Caracterização dos filmes livres de compostos ativos

5.3.1 Propriedade mecânica

Na tabela 17 podem ser observadas as propriedades mecânicas e a espessura dos substratos livre de compostos ativos: filmes à base de carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda (CMC:HPMC, 1:1) e do papel comestível

comercial. Os filmes produzidos (CMC, HPMC e blenda) apresentaram maior resistência a tração quando comparados com o papel comestível comercial, que é próprio para uso em impressora.

Tabela 18 - Espessura (mm), tensão na ruptura (T), alongação (E) e módulo elástico (ME) dos diferentes substratos livres de compostos ativos: papel comestível comercial (PC), filmes à base de carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda de CMC: HPMC (1:1).

Substrato	T (MPa)	E (%)	ME (MPa)	Espessura (mm)
PC	3,0±0,2 ^a	1,8±0,2 ^a	257,1±14,9 ^a	0,311±0,008 ^a
CMC	45,2±2,7 ^c	35,2±2,8 ^b	1297,5±105,5 ^c	0,081±0,004 ^b
HPMC	29,9±2,3 ^b	29,1±2,5 ^c	1141,4±92,6 ^b	0,082±0,004 ^b
Blenda	25,2±2,1 ^d	30,8±3,0 ^d	674,2±70,6 ^d	0,081±0,003 ^b

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Buanz et al (2015) avaliando filmes à base de carboximetilcelulose e polivinil álcool para impressão de cloridrato de clonidina, observaram, para o filme livre de fármaco, tensão na ruptura e módulo elástico iguais à 19,3±2,9 MPa e 547,8±54,2 MPa, respectivamente.

Desta forma, em relação às propriedades mecânicas os três filmes produzidos por *tape-casting* podem ser adequados para utilização em impressão, por apresentar maior resistência mecânica.

5.3.2 Ângulo de contato

A variação do ângulo de contato, em relação ao tempo, entre o extrato hidroalcoólico produzido com o mesocarpo de romã e os substratos podem ser observados na Tabela 19.

Para o papel comestível comercial (Tabela 19) todos os extratos avaliados foram completamente absorvidos ao final da análise (10 segundos), indicando que o papel comestível comercial possui alta capacidade de absorção do extrato de romã.

Genina et al. (2013a) também observaram para o papel comestível comercial (à base de amido de milho, xarope de milho, celulose, glicerina, açúcar, óleo vegetal, goma arábica, polissorbato 80, baunilha, dióxido de titânio e ácido cítrico) absorção completa da gota de solução de impressão com fármaco sintético (loperamida e cafeína), na análise de ângulo de contato, após 1 segundo de contato.

Na Figura 12 pode ser observada a variação do ângulo de contato, em relação ao tempo, do extrato hidroalcoólico obtido do mesocarpo de romã sobre os diferentes substratos. Para os filmes à base de carboximetilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e blenda foi observada, de maneira geral, redução maior do ângulo de contato até 1 segundo e depois, entre 1 e 10 segundos, não foi observada variação significativa do ângulo de contato (Figura 12). Isto indica que o papel comestível comercial possui uma capacidade maior de absorção do extrato que os filmes produzidos com carboximetilcelulose e hidroxipropilcelulose.

Genina et al. (2013b) avaliaram solução de impressão contendo mesilato de rasagilina em filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose e crospovidona e observaram ângulo de $34,4 \pm 2,0$ imediatamente após a solução de impressão ser depositada sobre o substrato. Os autores avaliaram o comportamento do ângulo em relação ao tempo de contato e observaram redução do ângulo, correlacionando com a presença do hidroxipropilmetilcelulose na matriz polimérica que é polímero altamente hidrofílico.

Adicionalmente, observou-se que no tempo inicial (Tabela 19 e Figura 12) os filmes de carboximetilcelulose apresentaram menor ângulo de contato, seguido dos

filmes de hidroxipropilcelulose e blenda. Isto mostra que o extrato de romã apresentou maior molhabilidade e espalhamento no filme à base de carboximetilcelulose.

Tabela 19 - Ângulo de contato entre os extratos hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sem concentração (0%) e com diferentes porcentagens de concentração, e dos diferentes substratos livres de compostos ativos: papel comestível comercial (PC), filmes à base de carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda de CMC: HPMC (1:1).

Substrato	Tempo (s)	Ângulo de contato(°)				
		Porcentagem de concentração				
		0%	10%	20%	30%	40%
PC	0	48,8±3,4 ^b	48,9±4,2 ^b	56,2±3,9 ^a	58,38±3,9 ^a	59,4±3,6 ^a
	1	9,4±1,3 ^c	20,1±6,0 ^b	30,2±6,8 ^{a,b}	31,1±6,6 ^a	35,6±7,0 ^a
	10	ND	ND	ND	ND	ND
CMC	0	25,8±0,7 ^c	26,5±1,1 ^{b,c}	27,3±1,8 ^b	28,3±1,2 ^a	29,1±1,6 ^a
	1	12,9±1,4 ^e	14,0±1,7 ^d	15,4±1,8 ^c	17,0±1,6 ^b	19,8±1,6 ^a
	10	7,8±2,3 ^e	9,6±2,5 ^d	12,9±1,6 ^c	15,2±1,6 ^b	18,6±1,6 ^a
HPMC	0	32,2±1,8 ^b	31,4±2,9 ^b	32,6±5,3 ^b	34,1±4,1 ^b	37,8±5,3 ^a
	1	21,2±5,3 ^{a,b}	22,2±5,6 ^{a,b}	20,9±4,5 ^{a,b}	17,8±5,3 ^b	22,4±4,2 ^a
	10	20,5±6,2 ^a	20,7±6,9 ^a	18,3±5 ^{a,b}	14,4±6,3 ^b	20,3±5,8 ^a
Blenda	0	38,4±2,0 ^{c,d}	40,3±3,4 ^{b,c}	41,4±2,3 ^{a,b}	43,7±2,8 ^a	37,7±3,8 ^d
	1	20,5±1,9 ^c	23,2±2,1 ^b	25,4±2,7 ^a	25,5±1,9 ^a	24,0±2,3 ^{a,b}
	10	20,1±1,8 ^d	22,8±2,2 ^c	24,9±3,5 ^{a,b}	25,6±1,8 ^a	23,4±2,3 ^{c,b}

Letras minúsculas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Figura 12 - Variação em relação ao tempo do ângulo de contato entre o extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, com porcentagem de concentração igual a 40%, sobre os substratos: papel comestível comercial (PC), filmes a base de carboximetilcelulose (CMC), filmes a base de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e blenda (B) de HPMC:CMC (1:1).

Fonte: Própria autoria.

Em relação aos valores observados para ângulo de contato, as matrizes poliméricas avaliadas podem ser potencialmente utilizadas como substrato para impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

5.3.3 Escolha do substrato para impressão

Conforme os resultados observados para as propriedades mecânicas e ângulo de contato, todos os filmes analisados apresentaram potencial de utilização como substrato de impressão.

Após serem retirados do suporte, o filme à base de carboximetilcelulose (Figura 13.b) permaneceu com o formato inicial, semelhante ao papel comercial (Figura 13.a), enquanto os filmes de hidroxipropilmetilcelulose (Figura 13.d) e blenda (Figura 13.c) se encurvaram, alterando seu formato inicial.

Figura 13 - Substratos para impressão, sendo eles: (a) - papel comestível comercial; (b) - filme à base de carboximetilcelulose; (c) - blenda à base de carboximetilcelulose:hidroxipropilcelulose (1:1); e (d) - filme à base de hidroxipropilcelulose.

(a)

(b)

(c)

(d)

Fonte: Própria autoria.

Para que o substrato seja utilizado em processos envolvendo impressão é necessário que ele mantenha o formato retilíneo de forma a permitir a passagem pela cabeça de impressão sem ser danificado (Figura 14). Como os filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose (Figura 13d) e blenda de carboximetilcelulose e

hidroxipropilmetilcelulose (Figura 13c) apresentaram estrutura curva após a sua confecção, isso inviabilizou o processo de impressão do extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã. Desta forma, apenas o filme à base de carboximetilcelulose (Figura 13b) e papel comestível comercial (Figura 13a) foram utilizados para a impressão do extrato.

Figura 14 - Parte interna da impressora Tanque de tinta L365 (Epson).

Fonte: Própria autoria.

5.4 Caracterização dos filmes com incorporação de extrato do mesocarpo de romã utilizando-se o método de impressão

5.4.1 Conteúdo de água

Observa-se na Tabela 20 o conteúdo de água para os diferentes substratos (papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilcelulose) sem impressão e com diferentes camadas de impressão (1 à 4 camadas) de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã. Em relação ao aumento das camadas de impressão não foi

observado variação significativa para os filmes à base de carboximetilcelulose, enquanto para os filmes de papel comestível foi observada redução do conteúdo de água com o aumento no número de camadas de impressão, porém apenas para o filme com 4 camadas. Observou-se que os filmes impressos em papel comestível comercial apresentaram menor conteúdo de água em comparação com os filmes impressos à base de carboximetilcelulose (Tabela 20).

Tabela 20 - Conteúdo de água (CA) dos substratos (papel comestível comercial e do filme à base de carboximetilcelulose) impresso com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Substrato	Número de camadas de impressão	CA (%)
Papel comestível comercial	0	13,9±0,6 ^b
	1	14,0±1,3 ^b
	2	13,6±1,2 ^b
	3	13,1±1,0 ^{b,c}
	4	12,3±0,8 ^c
Carboximetilcelulose	0	19,2±1,0 ^a
	1	19,2±0,6 ^a
	2	19,2±0,7 ^a
	3	19,6±0,9 ^a
	4	19,6±0,9 ^a

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Os resultados observados para o papel comercial comestível (à base de amido de batata) foram semelhantes aos reportados na literatura para filmes de amido. Piñeros-Hernandez et al. (2017) observaram para filmes à base de amido de mandioca, conteúdo de água igual a 15,7±1,5%.

Os filmes à base de carboximetilcelulose apresentaram conteúdo de água superior ao reportado na literatura. Buanz et al (2015) avaliando filmes à base de

carboximetilcelulose e polivinil álcool sem impressão e impresso com cloridrato de clonidina observaram conteúdo de umidade de $8,9 \pm 0,1$ e $6,6 \pm 1,1$, respectivamente.

5.4.2 Cor

Na Tabela 21 pode-se observar os parâmetros de cor (L^* , a^* e b^*) dos substratos (papel comestível comercial e dos filmes à base de carboximetilcelulose) com diferentes números de camada de impressão. Com o aumento do número de impressões foi observado redução da luminosidade (L^*) e croma a^* e aumento do croma b^* , independente do substrato utilizado. Comparando-se os valores de L^* , a^* e b^* com o sólido de cor (Figura 15), é possível correlacionar a redução dos valores de a^* e aumento de b^* com o aumento da coloração amarelada e o aumento do número de camadas de impressão no substrato. Este resultado era esperado devido a cor do extrato que foi utilizado para impressão (Figura 16). Para os filmes à base de carboximetilcelulose foram observados maiores valores para o croma b^* e maior redução do croma a^* . Os resultados corroboram com a cor dos filmes observadas visualmente (Figura 17), uma vez que foi constatado aumento na intensidade de cor amarela de acordo com o número de camadas, sendo que os filmes à base de carboximetilcelulose apresentaram um tom mais forte da cor amarela.

Tabela 21 - Luminosidade (L^*), croma a^* (a^*) e croma b^* (b^*) dos substratos (papel comestível comercial e filme à base de carboximetilcelulose) impressos com diferentes números de camada de impressão.

Substrato	Número de camadas de impressão	L^*	a^*	b^*
Papel comestível comercial	0	$93,92 \pm 0,15^a$	$-0,82 \pm 0,01^a$	$2,39 \pm 0,06^h$
	1	$91,11 \pm 0,92^b$	$-5,00 \pm 0,11^b$	$16,95 \pm 0,53^g$
	2	$90,55 \pm 0,42^{b,c}$	$-5,73 \pm 0,07^c$	$23,76 \pm 0,48^f$
	3	$86,80 \pm 3,31^e$	$-5,78 \pm 0,05^c$	$28,12 \pm 0,49^e$
	4	$87,88 \pm 0,33^{d,e}$	$-5,64 \pm 0,06^c$	$33,28 \pm 0,86^d$
Carboximetilcelulose	0	$90,71 \pm 0,04^{b,c}$	$-0,86 \pm 0,01^a$	$2,42 \pm 0,07^h$
	1	$89,12 \pm 0,29^{c,d}$	$-8,90 \pm 0,61^d$	$25,19 \pm 1,85^f$
	2	$88,32 \pm 0,53^{d,e}$	$-11,68 \pm 0,69^e$	$37,69 \pm 2,84^c$
	3	$87,84 \pm 1,26^{d,e}$	$-13,02 \pm 0,24^f$	$46,89 \pm 1,40^b$
	4	$86,64 \pm 0,21^e$	$-13,45 \pm 0,05^g$	$53,87 \pm 0,17^a$

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Figura 15 - Sólido de cor do sistema CIE Lab.

Fonte: adaptada de ColorCodeHex. Disponível em: <https://www.colorcodehex.com/color-model.html>. Acessada em 30/01/2017 (tradução nossa).

Figura 16 - Extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã com porcentagem de concentração igual a 40 % utilizando-se rotaevaporador.

Fonte: Própria autoria.

Figura 17 - Imagens dos substratos (papel comestível comercial e dos filmes à base de carboximetilcelulose) impressos com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão; (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; e (4) - com 4 camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

5.4.3 pH de superfície

Em relação ao pH de superfície (Tabela 22) não foi observada diferença significativa entre os substratos (papel comestível comercial e filme à base de

carboximetilcelulose) sem e com impressão de extrato hidroalcoólico de mesocarpo de romã. Todas as formulações apresentam pH de superfície igual à 6,8 para os três tempos avaliados (15, 30 e 60 min). Os valores observados foram próximos ao neutro, semelhante ao da saliva (pH 5,8-7,1).

Tabela 22 - pH de superfície dos substratos (papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilcelulose) impressos com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Substrato	Número de camadas de impressão	pH de superfície		
		15 min	30 min	60 min
Papel comestível comercial	0	6,8	6,8	6,8
	1	6,8	6,8	6,8
	2	6,8	6,8	6,8
	3	6,8	6,8	6,8
	4	6,8	6,8	6,8
Carboximetilcelulose	0	6,8	6,8	6,8
	1	6,8	6,8	6,8
	2	6,8	6,8	6,8
	3	6,8	6,8	6,8
	4	6,8	6,8	6,8

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Segundo Manhar et al. (2013) os veículos de liberação oral que apresentam um meio alcalino ou ácido podem causar irritação na mucosa bucal. Desta forma, os filmes avaliados neste trabalho, por não apresentar variação de pH, podem não apresentar irritação a mucosa bucal.

Outros pesquisadores observaram para compostos naturais e sintéticos, que foram incorporados por *casting*, resultados semelhantes aos observados neste trabalho. Chevala et al. (2015) observaram, para filmes a base de álcool polivinílico (PVA) contendo cloridrato de fluoxetina, pH de superfície na faixa de 6,5 – 6,8 semelhante ao pH da cavidade bucal, evitando irritação à mucosa bucal.

Garcia et al. (2017) reportaram para filmes com diferentes proporções de gelatina e amido aditivados com extrato de acerola pH próximos ao neutro (6,9), inferindo que estes filmes não apresentam potencial risco em relação a irritação da mucosa da cavidade oral.

5.4.4 Microscopia eletrônica de Varredura

Pode ser observado na Figura 18 as micrografias dos substratos (papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilcelulose) impressos com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Observou-se que o papel comestível comercial sem impressão apresentou uma superfície irregular com a presença de poros. Para os papeis com impressão também foram observados presença de poros independente do número de camadas de impressão (Figura 18).

Para os filmes à base de carboximetilcelulose não foi possível observar variação na superfície dos filmes sem e com impressão. De maneira geral, todos apresentaram uma superfície bem homogênea e lisa não sendo observadas gotas ou cristalização do extrato, mostrando que ele foi completamente absorvido pela matriz. Além disso, observou-se a formação de uma matriz com boa coesividade, sem apresentar separação de fase.

Genina et al. (2013a) avaliaram as micrografias de superfície de diferentes substratos (filme de politereftalato de etileno, filme à base de hidroxipropilcelulose e papel comestível comercial) impressos com loperamida e cafeína e observaram, para os filmes impressos com cafeína, recristalização na superfície de todos os substratos. E para os filmes impressos com solução de loperamida foram observadas pequenas gotas sobre a superfície dos filmes de politereftalato de etila, enquanto que o mesmo não foi

observado para os filmes de hidroxipropilcelulose e papel comestível comercial mostrando que a solução foi absorvida por esses substratos (GENINA et al., 2013a).

Figura 18 - Micrografias da superfície do papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilulose impressos com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, contendo diferentes números de camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

5.4.5 Microscopia de força atômica

Para os filmes produzidos com papel comercial comestível não foi possível obter as imagens de microscopia de força atômica devido a profundidade e a quantidade de poros presentes na superfície dos filmes, como observou-se na microscopia eletrônica de varredura (Figura 18). As imagens 2D e 3D dos filmes à base de carboximetilcelulose com e sem impressão podem ser observados na Figura 19.

Entre os filmes à base de carboximetilcelulose observou-se que o filme controle (sem impressão) apresentou pouca rugosidade. A primeira camada de impressão no filme provocou aumento da rugosidade da superfície (Figura 19). Isto pode ter ocorrido devido ao intumescimento da matriz polimérica após a absorção da primeira camada de extrato.

Por outro lado, o aumento do número de camadas de impressão provocou redução da rugosidade das superfícies, sendo que o filme com 4 camadas de impressão apresentou uma superfície semelhante ao filme controle (Figura 19). Esse resultado pode estar relacionado com a deposição sucessiva do extrato em cima do filme já impresso, pois o filme não consegue mais absorver o extrato das camadas seguintes, o que deixa a superfície mais lisa e homogênea.

A Figura 20 mostra a transição entre o filme à base de carboximetilcelulose sem impressão e após a primeira camada de impressão. Na imagem é possível observar a variação na superfície de lisa (sem impressão) para rugosa (com 1 camada de impressão).

Na literatura não foram reportados trabalhos que avaliaram imagens de microscopia de força atômica de filmes de liberação oral obtidos pelo método de impressão.

Figura 19 - Imagens de microscopia de força atômica da superfície em 2 dimensões (2D) e 3 dimensões (3D) dos filmes à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão; (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; e (4) - com 4 camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

Figura 20 - Imagens obtidas no microscópio de força atômica da borda do filme à base de carboximetilcelulose sem impressão e com 1 camada de impressão 2 dimensões (2D) e 3 dimensões (3D).

Fonte: Própria autoria.

5.4.6 Tempo de desintegração

O tempo de desintegração dos substratos (papel comestível comercial e filme a base de carboximetilcelulose) sem e com impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã pode ser observado na Tabela 23. Observou-se redução significativa do tempo de desintegração, devido ao aumento do número de camadas de impressão para os filmes produzidos com papel comestível comercial. Este resultado pode estar relacionado com a porosidade do papel comercial comestível observada após o processo de impressão (Figura 18).

Por outro lado, para os filmes à base de carboximetilcelulose foi observado aumento do tempo de desintegração com o aumento das camadas de impressão, sendo observada diferença significativa apenas para o filme controle e com 4 camadas de impressão. Entre os filmes de carboximetilcelulose impressos não foram observadas variações significativas (Tabela 23).

Entre os substratos utilizados verificou-se que os filmes à base de carboximetilcelulose apresentaram menor tempo de desintegração em relação ao papel comercial comestível, independentemente do número de camadas de impressão.

Tabela 23 - Tempo de desintegração do papel comercial e dos filmes à base de carboximetilcelulose com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Substrato	Número de camadas de impressão	Tempo (s)
Papel Comercial	0	233,6±23,2 ^a
	1	207,7±20,3 ^b
	2	185,8±15,4 ^c
	3	139,8±9,4 ^d
	4	123,5±11,7 ^e
Carboximetilcelulose	0	20,2±1,2 ^g
	1	25,2±2,1 ^{f,g}
	2	25,9±1,7 ^{f,g}
	3	27,6±2,2 ^{f,g}
	4	30,3±2,3 ^f

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0.05$) entre as medias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

De acordo com Jyoti et al. (2011), os filmes orais que apresentam tempo de desintegração inferior a 60 segundos são classificados como filmes de liberação rápida. Desta forma, os filmes à base de carboximetilcelulose podem ser classificados como filmes de liberação rápida

Resultados semelhantes foram observados por Buanz et al. (2015) que avaliaram filmes à base de polivinil álcool e carboximetilcelulose contendo cloridrato de clonidina, produzidos pelo método de *casting* e por impressão e observaram tempo de desintegração de 23,3±5,6 e 30,5±4,6, respectivamente.

5.4.7 Concentração de compostos fenólicos

Para os dois substratos avaliados (papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilcelulose) verificou-se que o aumento no número de camadas de impressão provocou aumento da concentração de compostos fenólicos (Tabela 24). Este aumento ocorreu de forma linear, como pode ser observado na Tabela 25.

Comparando a concentração de compostos fenólicos entre os dois substratos foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) apenas para a 4ª camada de impressão, sendo que o papel comercial apresentou menor concentração em relação ao filme de carboximetilcelulose (Tabela 24).

Tabela 24 - Variação da concentração de compostos fenólicos devido ao aumento do número de camadas de impressão do extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã em papel comestível comercial e filme à base de carboximetilcelulose.

Substrato	Número de camadas de impressão	Concentração de compostos fenólicos (mg/cm ²)
Papel Comercial	1	0,117±0,002 ^e
	2	0,218±0,005 ^d
	3	0,338±0,005 ^c
	4	0,446±0,008 ^b
Carboximetilelulose	1	0,121±0,007 ^e
	2	0,228±0,013 ^d
	3	0,349±0,017 ^c
	4	0,485±0,028 ^a

Letras minúsculas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias, pelo teste de Duncan, utilizando o software SAS 9.2.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 25 - Regressão linear da concentração de compostos fenólicos ($C_{\text{Fenólicos}}$) em relação ao número de camadas de impressão do extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã para cada substrato.

Substrato	Regressão linear	R ²
Papel comestível comercial	$C_{\text{Fenólicos}} = 0,6779 \cdot \text{NC} + 0,0101$	0,9996
Carboximetilcelulose	$C_{\text{Fenólicos}} = 0,7311 \cdot \text{NC} - 0,0156$	0,9981

Onde: $C_{\text{Fenólicos}}$ = concentração de compostos fenólicos (mg/in²); e NC = número de camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

Buanz et al (2011) avaliando a impressão de solução de sulfato de salbutamol em filme comestível de amido de batata observaram que a concentração obtida por múltiplas camadas de impressão foi inferior ao esperado com o aumento do número de camadas, resultado da erosão provocada pela da força de cisalhamento durante o manuseio e impressão.

5.4.8 Liberação *in vitro*

Nas Figuras 21 e 22 podem ser observados os perfis de liberação dos filmes impressos com extrato hidroalcoólico obtido do mesocarpo de romã. Como os compostos foram depositados na superfície dos substratos as análises foram realizadas nos dois lados dos substratos (lado com impressão e lado sem impressão). Como pode ser observado na Figura 21, para os filmes impressos em papel comestível comercial foi observada variação no perfil de liberação em relação ao lado de exposição do fármaco. Por outro lado, para os filmes à base de carboximetilcelulose (Figura 22) foi notado um comportamento bem semelhante para os dois lados dos filmes. Isto pode estar relacionado com a rápida dissolução que filmes de carboximetilcelulose apresentaram quando comparados com o papel comercial (Tabela 23). Os filmes produzidos com papel comestível comercial permaneceram na superfície durante toda análise (Figura 23.a), enquanto os filmes à base de carboximetilcelulose, quando entraram em contato com a solução tampão (pH 6,8) rapidamente entumeceram, ficando imersos nos primeiros 30 segundos de análise (Figura 23.b). Ao final da análise (após 140 minutos) ocorreu a completa dissolução dos filmes de carboximetilcelulose (Figura 23.d) enquanto o papel comercial ainda era visto na superfície da solução (Figura 23.c).

Figura 21 - Liberação de compostos fenólicos do papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã para os dois lados do substrato, com lado sem impressão em contato com a solução tampão (a) e lado com impressão em contato com a solução (b), com diferentes números de camada de impressão sendo: (1) - 1 camada de impressão; (2) - 2 camadas de impressão; (3) - 3 camadas de impressão; e (4) - 4 camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria

Figura 22 - Liberação de compostos fenólicos do filme a base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã para os dois lados do substrato, com lado sem impressão em contato com a solução tampão (a) e lado com impressão em contato com a solução (b), com diferentes números de camada de impressão sendo: (1) - 1 camada de impressão; (2) - 2 camadas de impressão; (3) - 3 camadas de impressão; e (4) - 4 camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

Figura 23 - Amostras de substratos impressos com 4 camadas de impressão em solução tampão fosfato salino (pH 6,8), sendo (a) - papel comestível comercial antes da análise de liberação; (b) filme à base de carboximetilcelulose antes da análise de liberação; (c) papel comestível comercial após análise de liberação; (d) filme à base de carboximetilcelulose depois da análise de liberação.

Fonte: Própria autoria.

5.4.9 Cinética de liberação

A cinética de liberação dos compostos fenólicos dos substratos (papel comestível comercial e filmes à base de carboximetilcelulose) impressos com diferentes números de camadas de extrato do mesocarpo de romã foi avaliada pelos modelos matemáticos de Ordem zero, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, e Peppas e Sahlin (Tabela 26 e 27).

Para todas as formulações avaliadas a cinética de liberação foi melhor ajustada pelos modelos Korsmeyer-Peppas e Peppas e Sahlin (Tabela 26 e 27), em função dos valores de R^2 ($R^2 > 0,90$).

No modelo de Korsmeyer-Peppas, o parâmetro k é a constante de cinética, que incorpora características estruturais e geométricas do mecanismo de liberação (KORSMEYER; PEPPAS, 1981). O parâmetro n é a constante relacionada com o

mecanismo de liberação do composto ativo, sendo que: quando n é igual à 0,45 a liberação ocorre pelo processo de difusão (difusão Fickiana clássica); n maior que 0,89 corresponde a cinética de liberação de ordem zero, que apresenta mecanismos de transporte do Caso II, ou seja, pelo fenômeno de intumescimento do polímero (relaxamento da matriz e liberação mediante erosão); e quando n está entre 0,45 e 0,89 indica cinética de transporte anômalo, ou seja uma combinação dos dois mecanismos de difusão e transporte de Caso II (KORSMEYER; PEPPAS, 1981).

Para os filmes obtidos com papel comestível comercial (Tabela 26) observou-se, de maneira geral, que os filmes analisados com o lado impresso em contato com a solução apresentaram maiores valores para o parâmetro k em relação ao substrato que foi analisado pelo lado sem impressão, demonstrando que a liberação do composto ativo foi mais rápida quando o lado impresso ficou em contato com a solução tampão (pH 6,8). Em relação ao parâmetro n , observou-se que o papel comestível com o lado impresso em contato com a solução apresentaram liberação por difusão Fickiana clássica ($n < 0,45$) e o lado sem impressão a liberação ocorre mediante o intumescimento, com relaxamento e erosão da matriz ($n > 0,89$) (Tabela 26). No processo de impressão, os compostos ativos foram depositados sobre a matriz, e como observado na análise de infravermelho o extrato não apresentou interação perceptível com a matriz. Era esperado que a exposição do lado impressão ao invés do lado sem impressão apresentasse uma liberação mais rápida do composto ativo. Desta forma, quando o filme é exposto pelo lado sem impressão o composto ativo precisa se difundir através da matriz para que ocorra a liberação na solução, o que acontece mediante relaxação e erosão da matriz.

Pelo modelo de Peppas e Sahlin observaram-se resultados semelhantes aos obtidos pelo modelo de Korsmeyer e Peppas (Tabela 26). Para o papel comestível comercial,

observou-se que os valores de k_2 foram superiores aos de k_1 quando foi analisado o lado sem impressão, indicando liberação devido a influência do relaxamento da matriz. Contudo, para o lado impresso os valores de k_1 foram maiores que k_2 , indicando liberação por difusão (Tabela 26).

Considerando-se o modelo de Korsmeyer e Peppas para todas as formulações impressas em filmes à base de carboximetilcelulose verificaram-se valores para o parâmetro k próximos e valores de n menores que 0,45, indicando que a liberação do composto ativos ocorreu por difusão Fickiana (Tabela 27). Apenas para o filme com uma camada de impressão e com o lado sem impressão em contato com a solução tampão (Tabela 27, CM1.a) verificou-se liberação anômala ($0,45 < n = 0,52 < 0,89$), cujo transporte ocorre tanto por inchamento quando por difusão, sendo que a liberação ocorreu em maior intensidade por difusão por apresentar um valor mais próximo à 0,45 do que à 0,89 ($n = 0,52$). Adicionalmente, esta formulação apresentou valores inferiores para o parâmetro k , indicando uma liberação mais lenta quando comparado com os outros filmes à base de carboximetilcelulose.

Pelo modelo de Peppas e Sahlin, observou-se para todas as formulações de filmes à base de carboximetilcelulose impressas com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã maior influência da difusão no processo de liberação dos compostos ativos, independentemente do número de camadas ou do lado em contato com a solução tampão (Tabela 27). Os resultados obtidos pelos modelos podem estar relacionados com a rápida desintegração que estes filmes apresentaram (Tabela 23).

Buanz et al. (2015) para filmes à base de polivinil álcool e carboximetilcelulose contendo cloridrato de clonidina, avaliaram a cinética de liberação (modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell) de filmes orais produzidos pelo método de *casting* e por impressão e verificaram que o modelo de

Hixson-Crowell apresentou o melhor ajuste para os dois métodos de produção. Os resultados foram semelhantes aos observados para os filmes à base de carboximetilcelulose impresso com extrato do mesocarpo de romã. Segundo os autores a liberação do fármaco (modelo de Hixson-Crowell) na matriz de polivinil álcool e carboximetilcelulose ocorreu por erosão, relacionando com a presença de grupos carboxílicos ionizáveis do carboximetilcelulose que aumentou a dissolução do polímero.

Observou-se nas Tabelas 28 e 29 que os perfis de liberação foram comparados pelos fatores de diferença (f_1) e similaridade (f_2). Segundo a Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA, 1997), duas curvas de dissolução são similares quando apresentam f_1 entre 0 e 15 e f_2 entre 50 e 100. Segundo fator de similaridade (f_2) todas as formulações apresentaram perfil de liberação semelhantes (Tabela 29). Entretanto, quando as curvas foram analisadas pelo fator de diferença (f_1) observou-se que houve diferença entre alguns perfis de liberação (Tabela 28). Para o fator de diferença, de um modo geral, observou-se que houve diferença entre os perfis de liberação dos substratos testados, quando comparado o papel comestível comercial com os filmes à base de carboximetilcelulose (Tabela 28).

Todas as amostras produzidas utilizando-se como substrato os filmes à base de carboximetilcelulose, em relação ao número de camadas de impressão e lado de exposição (com ou sem impressão), foram similares entre si com exceção do filme com 1 camada de impressão com o lado sem impressão em contato com a solução tampão (pH 6,8) que apresentou valores de f_1 maiores que 15 quando comparados com os outros filmes (Tabela 28). Para os filmes produzidos com papel comestível comercial observou-se que apenas os filmes com o lado da impressão em contato com a solução apresentaram semelhança no perfil de liberação.

Com base nos resultados obtidos acima pode-se concluir que a liberação dos compostos ativos presentes no extrato do mesocarpo de romã na cavidade bucal pode ser influenciada pelo substrato utilizado para a impressão bem como o lado em contato para liberação. Entretanto, estudos complementares são necessários para avaliar o comportamento destes filmes *in vivo* e a capacidade de absorção destes compostos pela mucosa bucal.

Buanz et al. (2015) avaliaram filmes à base de polivinil álcool e carboximetilcelulose contendo cloridrato de clonidina, produzidos pelo método de *casting* e por impressão e observaram que os filmes produzidos por ambos os métodos apresentaram perfil de liberação semelhantes ($f_1 = 1,25$ e $f_2 = 64,7$).

Tabela 26 - Modelos matemáticos de cinética de liberação de compostos fenólicos de papel comestível comercial (PC) com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Modelo matemático	Ordem Zero		Higuchi		Korsmeyer-Peppas			Peppas e Sahlin		
Parâmetros	k	R ²	k _h	R ²	k _k	n	R ²	k ₁	k ₂	R ²
PC1.a	0,006	0,9232	0,052	0,7315	0,001	1,65	0,9758	-0,023	0,007	0,9223
PC1.b	0,055	0,3296	0,112	0,4733	0,376	0,21	0,8608	0,124	0,099	0,9520
PC2.a	0,009	0,9841	0,079	0,917	0,019	0,83	0,9831	-0,012	0,012	0,9938
PC2.b	0,180	0,1894	0,190	0,254	0,518	0,13	0,9325	0,488	-0,020	0,9438
PC3.a	0,008	0,9864	0,069	0,8828	0,007	1,02	0,9866	0,003	0,007	0,976
PC3.b	0,094	0,2093	0,107	0,21	0,428	0,16	0,8901	0,393	-0,032	0,8888
PC4.a	0,007	0,9688	0,062	0,8187	0,002	1,32	0,9845	-0,004	0,007	0,9672
PC4.b	0,096	0,4750	0,115	0,3491	0,429	0,19	0,9278	0,340	-0,020	0,9530

Nota: (PC1.a) - com 1 camada de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC1.b) - com 1 camada de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC2.a) - com 2 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC2.b) - com 2 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC3.a) - com 3 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC3.b) - com 3 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC4.a) - com 4 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; e (PC4.b) - com 4 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 27 - Modelos matemáticos de cinética de liberação de compostos fenólicos de filmes à base de carboximetilcelulose (CM) com diferentes números de camadas de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Modelo matemático	Ordem Zero		Higuchi		Korsmeyer-Peppas			Peppas e Sahlin		
Parâmetros	k	R ²	k _h	R ²	k _k	n	R ²	k ₁	k ₂	R ²
CM1.a	0,011	0,878	0,091	0,9784	0,083	0,52	0,9791	0,045	0,009	0,9974
CM1.b	0,014	0,4953	0,101	0,9029	0,211	0,32	0,9885	0,190	-0,014	0,9939
CM2.a	0,015	0,3198	0,106	0,8288	0,255	0,29	0,9731	0,213	-0,013	0,9935
CM2.b	0,020	0,4962	0,108	0,8562	0,235	0,32	0,9551	0,124	0,018	0,9963
CM3.a	0,014	0,5447	0,100	0,9187	0,194	0,34	0,9822	0,158	-0,006	0,9858
CM3.b	0,015	0,5125	0,105	0,8972	0,206	0,34	0,9641	0,142	0,003	0,9778
CM4.a	0,013	0,7475	0,095	0,9738	0,140	0,41	0,9894	0,121	-0,003	0,9924
CM4.b	0,014	0,5021	0,099	0,9006	0,196	0,33	0,9709	0,150	-0,002	0,9773

Nota: (CM1.a) - com 1 camada de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM1.b) - com 1 camada de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM2.a) - com 2 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM2.b) - com 2 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM3.a) - com 3 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM3.b) - com 3 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM4.a) - com 4 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; e (CM4.b) - com 4 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 28 - Fator de diferença (f_1) para perfil de liberação de compostos fenólicos de papel comestível comercial (PC) e filmes à base de carboximetilcelulose (CM) com diferentes número de camada de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Referência	Teste															
	CM1.a	CM1.b	CM2.a	CM2.b	CM3.a	CM3.b	CM4.a	CM4.b	PC1.a	PC1.b	PC2.a	PC2.b	PC3.a	PC3.b	PC4.a	PC4.b
CM1.a	0	20	29	29	19	24	11	18	46	44	19	55	27	43	34	51
CM1.b	17	0	8	10	3	9	10	6	55	21	32	29	39	21	45	25
CM2.a	22	7	0	5	8	5	14	9	58	14	36	22	43	16	49	17
CM2.b	22	9	5	0	9	4	14	9	58	14	36	23	43	18	49	17
CM3.a	16	3	9	9	0	7	7	4	54	21	30	31	38	23	45	27
CM3.b	19	8	6	5	7	0	12	7	56	17	33	28	40	21	47	22
CM4.a	10	11	17	17	8	13	0	9	51	30	26	41	33	31	40	36
CM4.b	15	7	10	10	4	8	8	0	54	23	30	32	37	22	44	28
PC1.a	84	121	137	137	119	128	103	116	0	165	52	185	36	163	21	177
PC1.b	31	18	12	12	17	15	23	19	62	0	42	10	49	9	54	9
PC2.a	23	47	56	56	44	50	35	42	34	74	0	88	14	74	22	82
PC2.b	36	22	18	19	24	22	29	24	65	10	47	0	52	8	58	8
PC3.a	36	64	74	74	61	68	50	59	26	95	16	110	0	93	11	104
PC3.b	30	18	14	17	19	18	24	18	62	9	43	9	48	0	54	13
PC4.a	52	83	95	95	80	88	68	78	17	119	27	135	13	117	0	129
PC4.b	34	20	15	15	21	18	27	22	64	8	45	9	51	12	56	0

Nota: (CM1.a) - com 1 camada de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM1.b) - com 1 camada de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM2.a) - com 2 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM2.b) - com 2 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM3.a) - com 3 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM3.b) - com 3 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM4.a) - com 4 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM4.b) - com 4 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC1.a) - com 1 camada de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC1.b) - com 1 camada de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC2.a) - com 2 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC2.b) - com 2 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC3.a) - com 3 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC3.b) - com 3 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC4.a) - com 4 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; e (PC4.b) - com 4 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão.

Fonte: Própria autoria.

Tabela 29 - Fator de similaridade (f_2) para perfil de liberação de compostos fenólicos de papel comestível comercial (PC) e filmes à base de carboximetilcelulose (CM) com diferentes número de camada de impressão de extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã.

Referência	Teste															
	CM1.a	CM1.b	CM2.a	CM2.b	CM3.a	CM3.b	CM4.a	CM4.b	PC1.a	PC1.b	PC2.a	PC2.b	PC3.a	PC3.b	PC4.a	PC4.b
CM1.a	100	90	85	85	91	88	96	90	76	76	90	73	84	76	80	75
CM1.b	90	100	97	96	99	97	96	98	71	85	80	81	77	85	74	84
CM2.a	85	97	100	99	97	98	91	97	69	89	77	84	74	88	71	89
CM2.b	85	96	99	100	96	99	90	96	68	88	76	82	73	86	71	88
CM3.a	91	99	97	96	100	98	97	99	71	85	81	80	77	84	75	84
CM3.b	88	97	98	99	98	100	93	98	70	86	78	81	75	84	73	85
CM4.a	96	96	91	90	97	93	100	96	74	80	86	77	81	80	78	79
CM4.b	90	98	97	96	99	98	96	100	71	85	80	80	78	84	75	84
PC1.a	76	71	69	68	71	70	74	71	100	65	83	63	91	65	96	64
PC1.b	76	85	89	88	85	86	80	85	65	100	70	90	69	94	67	94
PC2.a	90	80	77	76	81	78	86	80	83	70	100	68	94	70	89	69
PC2.b	73	81	84	82	80	81	77	80	63	90	68	100	67	96	65	93
PC3.a	84	77	74	73	77	75	81	78	91	69	94	67	100	69	97	68
PC3.b	76	85	88	86	84	84	80	84	65	94	70	96	69	100	67	92
PC4.a	80	74	71	71	75	73	78	75	96	67	89	65	97	67	100	66
PC4.b	75	84	89	88	84	85	79	84	64	94	69	93	68	92	66	100

Nota: (CM1.a) – com 1 camada de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM1.b) - com 1 camada de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM2.a) - com 2 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM2.b) - com 2 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM3.a) - com 3 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM3.b) - com 3 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (CM4.a) - com 4 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (CM4.b) - com 4 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC1.a) - com 1 camada de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC1.b) - com 1 camada de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC2.a) - com 2 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC2.b) - com 2 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC3.a) - com 3 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; (PC3.b) - com 3 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão; (PC4.a) - com 4 camadas de impressão e lado sem impressão em contato com a solução tampão; e (PC4.b) - com 4 camadas de impressão e lado com impressão em contato com a solução tampão.

Fonte: Própria autoria.

5.4.10 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Nas Figuras 24 e 25 podem ser observados os espectros de absorção para o papel comestível comercial e para os filmes à base de carboximetilcelulose impressos com diferentes números de camadas de impressão, respectivamente.

Analisando o espectro do substrato de papel comestível comercial (à base de amido de batata) foram observadas bandas de absorção na região de 3322, 2925, 2855, 1745, 1640, 1149, 1015, 998, 930, 850, 760 cm^{-1} , similar aos reportados na literatura para filmes de amido. As bandas na região de 3322 e 2925 cm^{-1} estão relacionadas com o estiramento do grupo OH- e CH₂, respectivamente para filmes à base de amido de batata (Oleyaei et al., 2016). Bandas na região de 1740 são relacionadas ao grupo carbonila (CO), enquanto que na região 1640 há a confirmação da presença de água na matriz (Oleyaei et al., 2016). Na faixa de 1136-763 cm^{-1} , Xu et al. (2005) atribuíram ao alongamento do grupo C-O para filmes a base de amido de milho.

Para os filmes à base de carboximetilcelulose foram observadas bandas de absorção na região de 3275, 2880, 1590, 1415, 1321 e 1022 cm^{-1} . Segundo a literatura, as bandas ao redor de 3275 e 2880 são devido ao estiramento do OH e C-H, respectivamente (BISWAL, SINGH, 2004; BUANZ et al., 2015). A banda ao redor de 1590 cm^{-1} é atribuída à vibração do grupo COO⁻ (YANG et al., 2009). As bandas próximas ao redor de 1415 e 1321 cm^{-1} estão relacionadas ao dobramento angular do grupo -CH₂ e à vibração de flexão do grupo -OH, respectivamente (BISWAL, SINGH, 2004). A banda próxima ao 1022 é devido ao alongamento CH-O-CH₂ (BISWAL, SINGH, 2004).

Figura 24 - Espectros de absorção de infravermelho para papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; (4) - com 4 camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

Figura 25 - Espectros de absorção de infravermelho para filme à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; (4) - com 4 camadas de impressão

Fonte: Própria autoria.

Em relação ao aumento do número de camadas de impressão, não foram observadas novas bandas de absorção ou deslocamento no espectro nem deslocamento de banda, o que sugere que não houve interação química entre o extrato e os substratos.

5.4.11 Difração de Raio-X

Os difratogramas de raio-X dos filmes de papel comestível comercial e à base de carboximetilcelulose impressos com extratos do mesocarpo de romã podem ser observados nas Figuras 26 e 27, respectivamente. Os dois espectros de raio-X confirmam a natureza amorfa dos substratos sem e com impressão do extrato, bem como da solução de extrato.

Figura 26 - Difratomogramas de raio-X para papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; (4) - com 4 camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

Figura 27 - Difratogramas de raio-X para filme à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã, sendo: (0) - controle sem impressão, (1) - com 1 camada de impressão; (2) - com 2 camadas de impressão; (3) - com 3 camadas de impressão; e (4) - com 4 camadas de impressão.

Fonte: Própria autoria.

Janßen et al. (2013) avaliaram a impressão de mesilato de rasagilina em filmes à base de hidroxipropilmetilcelulose e crospovidone e observaram que o mesilato apresentou picos cristalinos na sua forma pura. Entretanto, após o processo de fabricação dos filmes por impressão (flexográfica) não houve recristalização do fármaco.

Buanz et al. (2015) observaram, para filmes à base de polivinil álcool e carboximetilcelulose com adição cloridrato de clonidina, comportamento amorfo tanto para os filmes obtidos por casting quanto para os filmes impressos.

Nos últimos anos, os produtos farmacêuticos no estado amorfo têm ganhado interesse, pois apresentam propriedades favoráveis em comparação com o seu equivalente cristalino, como aumento da solubilidade, podendo melhorar a dissolução e a biodisponibilidade do fármaco (GRAESER et al., 2010).

5.4.12 Estabilidade

A estabilidade dos filmes impressos pode ser observada nas Figuras 28 e 29. Observou-se que os compostos fenólicos apresentaram boa estabilidade no papel comestível comercial (Figura 28) e nos filmes a base de carboximetilcelulose (Figura 29) à temperatura ambiente na presença de luz no período de 196 dias.

Figura 28 - Estabilidade dos compostos fenólicos do papel comestível comercial impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã com diferentes números de camadas de impressão: PC1 - 1 camada; PC2 - 2 camadas; PC3 - 3 camadas; e PC4 - 4 camadas.

Fonte: Própria autoria.

Figura 29 - Estabilidade dos compostos fenólicos do filme à base de carboximetilcelulose impresso com extrato hidroalcoólico do mesocarpo de romã com diferentes números de camada de impressão: CMC1 - 1 camada; CMC2 - 2 camadas; CMC3 - 3 camadas; e CMC4 - 4 camadas.

Fonte: Própria autoria.

Resultado semelhante para filmes de liberação oral produzidos por *casting* foi reportado na literatura. Borges e Carvalho (2015) observaram, para filmes à base de gelatina e colágeno hidrolisado contendo extrato etanólico de própolis, que a concentração de compostos fenólicos não apresentou variação após 12 semanas de armazenamento.

Desta forma, a técnica de impressão pode ser uma boa alternativa para incorporação de compostos fenólicos do extrato de romã em matrizes poliméricas.

6 CONCLUSÕES

Dentre os extratos obtidos de diferentes partes da fruta e folhas da romãzeira (*Punica granatum* L.) o extrato obtido do mesocarpo da romã, utilizando como solvente solução hidroalcoólica (70%) e temperatura de extração de 70°C por 30 minutos apresentou maior concentração de compostos fenólicos e flavonoides.

Este extrato, puro e com diferentes porcentagens de concentração, apresentaram viscosidade e tensão superficial similares aos valores reportados na literatura para solução contendo fármaco utilizado para impressão de filmes de liberação oral em impressoras piezoelétricas.

Dentre os substratos avaliados, observou-se que os filmes produzidos à base de hidroxipropilmetilcelulose e blenda de carboximetilcelulose:hidroxipropilcelulose (1:1), apesar da resistência mecânica, não foram adequados para a impressão por mudarem a sua conformação após serem retirados da placa e cortados. Pois isso, foram utilizados como substrato de impressão o filme à base de carboximetilcelulose e o papel comestível comercial.

Os substratos com e sem impressão apresentaram pH de superfície próximo ao pH da cavidade bucal e por essa razão não devem provocar irritação à mucosa bucal. Os substratos impressos apresentaram concentração de compostos fenólicos proporcional ao número de camadas de impressão, sendo possível a produção de filmes com concentração sob demanda, dependendo da aplicação e das necessidades de cada indivíduo.

Os filmes obtidos com o papel comestível comercial apresentaram maior tempo de desintegração e liberação mais lenta dos compostos ativos, quando comparados com os filmes à base de carboximetilcelulose. Desta forma a escolha da matriz é importante para garantir o tempo e o modo que estes compostos serão liberados no sistema, sendo

importante a avaliação desses parâmetros *in vivo*. Adicionalmente os compostos fenólicos apresentaram boa estabilidade no período de armazenamento de 196 dias, à temperatura ambiente.

Desta forma, a técnica de impressão pode ser uma boa alternativa para incorporação de compostos fenólicos do extrato de romã em matrizes poliméricas, já que após a impressão os filmes apresentaram estabilidade dos compostos ativos por um longo período de armazenamento. Além disso, esta técnica possui a vantagem de tornar possível a produção em escala industrial de filme com extratos naturais e ainda com concentração sob demanda devido a facilidade de obter multicamadas de impressão.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABD-ELBARY, A. et al. Laminated sponges as challenging solid hydrophilic matrices for the buccal delivery of carvedilol microemulsion systems: Development and proof of concept via mucoadhesion and pharmacokinetic assessments in healthy human volunteers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 82, p. 31-44, 2016.

ABRUZZO, A. et al. Mucoadhesive Buccal Tablets Based on Chitosan/Gelatin Microparticles for Delivery of Propranolol Hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 104, n. 12, p. 4365-4372, 2015.

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

ABUBAKER, O. Polyvinyl Alcohol. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 564-565.

AKHTAR, N. et al. Development of skin-friendly dermatological water-in-oil emulsion of pomegranate juice. **Proceedings of the Pakistan Academy of Science**, Islamabad, v. 49, n. 4, p. 269-278, 2012.

AL-DHUBIAB, B. E. et al. Formulation and evaluation of nano based drug delivery system for the buccal delivery of acyclovir. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 136, p. 878-884, 2015.

ALI, S. I. et al. HPLC-Analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, Melbourne, v. 6, n. 4, p. 348-355, 2014.

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

AMMAR, H. O. et al. Design and In Vitro/In Vivo Evaluation of Ultra-Thin Mucoadhesive Buccal Film Containing Fluticasone Propionate. **AAPS Pharmscitech**, Arlington, v. 18, n. 1, p. 93-103, 2017.

AMYRGIALAKI, E. et al. Optimisation of the extraction of pomegranate (*Punica granatum*) husk phenolics using water/ethanol solvent systems and response surface methodology. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 59, p. 216-222, 2014.

AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. Ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.

ARABESTANI, A. et al. Characterization and antioxidante activity of bitter vetch protein-based films containing pomegranate juice. **Lwt - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 74, p. 77-83, 2016.

ASADI-GHARNEH; H. A.; MOHAMMADZAMANI, M.; KARIMI, S. Evaluation of physico-chemical properties and bioactive compounds of some Iranian pomegranate cultivars. **International of Journal of Fruit Science**, Filadélfia, v. 17, n. 2, p. 175-187, 2017.

BACCARIN, T.; MITJANS, M.; RAMOS, D.; LEMOS-SENNA, E.; VINARDELL, M. P. Photoprotection by *Punica granatum* seed oil nanoemulsion entrapping polyphenol-rich ethyl acetate fraction against UVB-induced DNA damage in human keratinocyte (HaCaT) cell line. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Lausana, v. 153, p. 127-136, 2015.

BALA, R. et al. Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, Mumbai, v. 3, n. 2, p. 67-76, 2013.

BALAKRISHNA, T. et al. Formulation and Evaluation of Doxylamine Succinate Fast Dissolving Buccal Films. **Asian Journal of Pharmaceutics**, Mandsaur, v. 10, n. 3, p. S313-S319, 2016.

BARZOKI, Z. M. et al. Formulation, in vitro evaluation and kinetic analysis of chitosan-gelatin bilayer muco-adhesive buccal patches of insulin nanoparticles. **Journal of Microencapsulation**, Londres, v. 33, n. 7, p. 613-624, 2016.

BATISTA, A. L. A. et al. Clinical efficacy analysis of the mouth rising with pomegranate and chamomile plant extracts in the gingival bleeding reduction. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, Amsterdam, v. 20, p. 93-98, 2014.

BEKIR, J. et al. Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 55, p. 470-475, 2013.

BENSAAD, L. A. et al. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Londres, v. 17, p. 1-10, 2017.

BHATI, R.; NAGRAJAN, R. K. A detailed review on oral mucosal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, Bangalore, v. 3, n. 03, p. 659-681, 2012.

BIOALLIANCE PHARMA. COSTANTINI, D. **Fast dissolving drug delivery systems**. n. WO2011117313-A1, 29 set. 2011

BISWAL, D. R.; SINGH, R. P. Characterisation of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. **Carbohydrate Polymers**, Barking v. 57, n. 4, p. 379-387, 2004.

BONILLA, J. et al. Effect of the incorporation of antioxidants on physicochemical and antioxidante properties of wheat starch-chitosan films. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 118, p. 271-278, 2013.

BORGES, J. G. et al. Lecithin, gelatina and hydrolyzed collagen orally disintegrating films: functional properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 86, p. 907-916, 2016.

BORGES, J. G.; CARVALHO, R. A. Orally disintegrating films containing própolis: properties and release profile. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington , v. 104, n. 4, p. 1431-1439, 2015.

BRASIL, RESOLUÇÃO RDC, nº 35, de 13 de janeiro de 2017. **Lista de Medicamentos de referência**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/3186640/Lista+A+13-01-2017.pdf/a0b9e2a9-3d91-45c6-8144-853ac9b93a99>. Acessado em: 15/03/2017.

BRASIL, RESOLUÇÃO RDC, nº 35, de 16 de maio de 2013. **Lista de Medicamentos de referência**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://sinfargo.org.br/site/wp-content/uploads/2013/06/Lista+A+farmacos+Isolados-atualizada-em-16-05-2013.pdf>. Acessado em: 15/03/2017.

BRASIL, RESOLUÇÃO RDC, nº 35, de 27 de março de 2009. **Lista de Medicamentos de referência**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/referencia/lista.pdf>. Acessado em: 15/03/2017.

BUANZ, A. B. M. et al. Ink-jet printing versus solvent casting to prepare oral films: Effect on mechanical properties and physical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 494, n. 2, p. 611-618, 2015.

BUANZ, A. B. M. et al. Preparation of personalized-dose salbutamol sulphate oral films with thermal ink-jet printing. **Pharmaceutical Research**, Estugarda, v. 28, p. 2386-2392, 2011.

CABLE, C. G. Sodium Alginate. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Expipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 622-624.

CENCI, S. A. **Boas práticas de pós-colheita de frutas e hortaliças na agricultura familiar**. In: Fenelon do Nascimento Neto. (org). *Recomendações básicas para aplicação das boas práticas agropecuárias e de fabricação na agricultura familiar*. 1^a ed. Brasília: Embrapa Informações Tecnológicas, 2006, p. 67-80.

CHEN, Y. et al. Variation in concentrations of major bioactive compounds in *Prunella vulgaris* L. related to plant parts and phenological stages. **Biological Research**, Santiago, v. 45,n. 2, p. 171-175, 2012.

CHEVALA, N. T. et al. Design and development of fluoxetine hydrochloride oro flash films to alleviate major depressive disorder. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, Mumbai, v.45, n. 6, p. 493-501, 2015.

CMG PHARMACEUTICAL CO. KIM, Y. S.; SHI, J. H. **Fast-dissolving oral film preparation comprising aripiprazole**. n. US20150196558. 16 jul. 2015.

DAHL, T. C. Ethylcellulose. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Expipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 262-267.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolic: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, Basel, v. 15, p. 7313-7352, 2010.

DELGADO, N. T. B. et al. Pomegranate extract enhances endothelium-dependent coronary relaxation in isolated perfused hearts from spontaneously hypertensive ovariectomized rats. **Frontiers in Pharmacology**, Lausana, v. 7,n. 522, p. 1-12, 2017.

DISILVESTRO, R. A.; DISILVESTRO, D. J.; DISILVESTRO, D. J. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 23, p. 1123-1127, 2009.

DIXIT, R. P.; PUTHLI, S. P. Oral strip technology: overview and future potential. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 139, n. 2, p. 94-107, 2009.

EL-ENIN, A. S. M. A.; OSMAN, D. A. Preparation and evaluation of fast dissolving oral films containing metoclopramide hydrochloride. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, Bulgária, v. 12, n. 4, p. 1430-1443, 2015.

ELFALLEH, W. et al. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. **Journal of Medicinal Plants Research**, Lagos, v. 6, p. 4724-4730, 2012.

FISCHER, U. A. et al. Influence of origin source, different fruit tissue and juice extraction methods on anthocyanin, phenolic acid, hydrolysable tannin and isolariciresinol contents of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruits and juices. **European Food Research and Technology**, Berlim, v. 237, n. 2, p. 209-221, 2013.

FISCHER, U. A.; CARLE, R.; KAMMERER, D. R. Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 127, p. 807-821, 2011.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms**, Estados Unidos, U.S. Department of Health and Humam Services. 1997.

FOSS, S. R et al. Antifungal activity of pomegranate peel extract and isolated compound punicalagin against dermatophytes. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, Londres, v. 13:32, p. 1-6, 2014.

GANS, B-J.; DUINEVELD, P. C.; SCHUBERT, U. S. Inkjet printing of polymers: state of the art and future developments. **Advanced Materials**, Deerfield Beach, v. 16, n. 3, p. 203-2013, 2004.

GARCIA, V. A. S. et al. Gelatin and pregelatinized starch orally disintegrating films: Properties and stability of vitamin C. **Journal of Applied Polymer Science**, Nova York, v. 134, p. 44841 (1-9), 2017.

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

GAUTAM, R. K. et al. Comparative evaluation of anti-arthritic activity of *Pongamia pinnata* (Linn.) pierre and *Punica granatum* Linn: an *in vitro* study. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, India, v. 5, n. 4, p. 721-724, 2013.

GEETHALAKSHMI, R. et al. Evaluation of Antioxidant and Wound Healing Potentials of *Sphaeranthus amaranthoides* Burm.f. **BioMed Research International**, Nova York, v. 2013, p. 1-7, 2013.

GENINA, N. et al. Behavior of printable formulations of loperamide and caffeine on different substrates – Effect of print density in inkjet printing. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam v. 453, p. 488-497, 2013a.

GENINA, N. et al. Evaluation of different substrates for inkjet printing of rasagiline mesylate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Estugarda, v. 85, p. 1075-1083, 2013b.

GENINA, N. et al. Tailoring controlled-release oral dosage forms by combining inkjet and flexographic printing techniques. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 47, p. 615-623, 2012.

GOOLE, J.; AMIGHI, K. 3D printing in pharmaceutics: A new tool for designing customized drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, n. 1-2, p. 376-394, 2016.

GÖZLEKÇİ, S. et al. Total phenolic distribution of juice, peel, and seed extract of four pomegranate cultivars. **Pharmacognosy Magazine**, Bangalore, v. 7, n. 26, p. 161-164, 2011.

GRAESER, K. A. et al. The Role of Configurational Entropy in Amorphous Systems. **Pharmaceutics**, Basel, v. 2, n. 2, p. 224-244, 2010.

HAGHIGHIAN, M. K. et al. Pomegranate (*Punica granatum* L.) peel hydro alcoholic extract ameliorates cardiovascular risk factors in obese women with dyslipidemia: A double blind, randomized, placebo controlled pilot study. **European Journal of Integrative Medicine**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 676-682, 2016.

HÄUSLER, O. Starch. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 685-691.

HAYOUNI, E. A. et al. Hydroalcoholic extract based-ointment from *Punica granatum* L. peels with enhanced *in vivo* healing potential on dermal wounds. **Phytomedicine**, Estugarda, v. 18, n. 11, p. 976-984, 2011.

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.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Science**, Washington, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961.

HOOTON, J. C. Carboxymethylcellulose Sodium. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 118-121.

HOUSTON, D. M. J. et al. Anti-inflammatory activity of *Punica granatum* L. (Pomegranate) rind extracts applied topically to *ex vivo* skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Estugarda, v. 112, p. 30-37, 2017.

HUANG, J. et al. Microwave assisted extraction of flavonoids from pomegranate peel and its antioxidante activity. **BIO Web of Conferences**, Paris, v. 8, p. 1-6, 2017.

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

IRFAN, M. et al. Orrally disintegrating films: A modern expansion in drug delivery system. **Saudi Pharmaceutical Journal**, Riade, v. 24, p. 537-546, 2016.

JANI, R.; PATEL, D. Hot melt extrusion: Na industrially feasible approach for casting orodispersible film. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hong Kong, v. 10, n. 4, p. 292-305, 2015.

JANßSEN, E. M. et al. Drug-printing by flexographic printing technology – A new manufacturing process for oradispersible films. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 441, p. 818-825, 2013.

JONES, D. S. Chitosan. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 159-161

KABIR, M. A.; REO, J. P. Hydroxypropyl Cellulose. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 317-322.

KANDEMIR, F. M. et al. Effects of oral administrations of pomegranate seed extract on surgical wound healing in rabbits. **Revue de Médecine Vétérinaire**, França, v. 8, p. 400-408, 2013.

KANEIRA, M. J.; BAPODARA, M. B.; CHANDA, S. V. Effect of extraction techniques and solvents on antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) leaf and stem. **Food Analytical Methods**, Nova York, v. 5, p. 396-404, 2012.

KARKI, S. et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Hong Kong, v. 11, n 5, p. 559-574, 2016.

KASSEM, A. A. et al. Self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) with enhanced solubilization of nystatin for treatment of oral candidiasis: Design, optimization, *in vitro* and *in vivo* evaluation. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 218, p. 219-232, 2016.

KAUR, C. D.; SARAF, S. Development of photoprotective creams with antioxidant polyphenolic herbal extracts. **Research Journal of Medicinal Plant**, Nova York, v. 6, n. 1, p. 83-91, 2012.

KHAN S. et al. Conversion of sustained release omeprazole loaded buccal films into fast dissolving strips using supercritical carbon dioxide (scCO₂) processing, for potential paediatric drug delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Amsterdam, v. 93, p. 45-55, 2016.

KHATOON, N.; RAO, N. G. R.; REDDY, B. M. Overview on Fast Dissolving Oral Films. **International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences**, India, v. 1, n. 1, p. 63-75, 2013.

KIANFAR, F. et al. Novel films for drug delivery via the buccal mucosa using model soluble and insoluble drugs. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Nova York, v. 38, n. 10, p. 1207-1220, 2012.

KOLAND, M.; CHARYULU, N.; PRABHU, P. Mucoadhesive films of losartan potassium for buccal delivery: desing and characterization. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, Bangalore, 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, n. 3, p. 211-227, 1981.

LABTEC GMBH. BREITENBACH, A.; SCHWIER, N. **Rapidly disintegrating oral film formulation for olanzapin**. n. WO2012110222-A1, 23 ago. 2012.

LAHAM, S. A.; FADEL, F. M. The anti-bacterial effect of *Punica granatum* extracts against antibiotic resistant *Pasteurella haemolytica*. **Jundishapur Journal of microbiology**, Avaz, v. 6, n. 9, p. 1-5, 2013.

LAM, J. K. W. et al. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. **Advanced Dug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 73, p. 50-62, 2014.

- LE, H. P. Progress and trends in ink-jet printing technology. **Journal of Imaging Science and Technology**, Springfield, v. 42, n. 1, p. 49-62, 1998.
- LEMOS, M. et al. *Copaifera langsdorffii*: evaluation of potential gastroprotective of extract and isolated compounds obtained from leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 25, n. 3, 2015.
- 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, G. et al. Effects of supercritical CO₂ extraction parameters on chemical composition and free radical-scavenging activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 90, n. 3, p. 573-578, 2012.
- LOLAYEKAR, N.; SHABHAG, C. Polyphenols and oral health. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, Joinville, v. 9, n. 1, p. 74-84, 2011.
- LOU, Y-Q. et al. Determination of punicalagin and ellagic acid in vaginal effervescent tablets of *Punica granatum* peel extracts by RP-HPLC. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, Shaoyang, v. 42, n. 10, p. 2011-2013, 2011.
- MAHESWARI, K. M. et al. Development and evaluation of mouth dissolving films of amlodipine besylate for enhanced therapeutic efficacy. **Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 2014, p. 1-10, 2014.
- MANDAL, A.; BISHAYEE, A. LAM, C. W. K. Mechanism of breast cancer preventive action of pomegranate: Disruption of estrogen receptor and Wnt/ β -catenin signaling pathways. **Molecules**, Basileia, v. 20, n. 12, p. 22315-22328, 2015.
- MANHAR, S.; SURESH, P. K. Diltiazem-loaded buccoadhesive patches for oral mucosal delivery: Formulation and in vitro characterization. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, India, v. 3, n. 08, p. 075-079, 2013.
- MANIRUZZAMAN, M. et al. Development and optimization of ketoconazole oral strips by means of continuous hot-melt extrusion processing. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 68, n. 7, p. 890-900, 2016.
- MCDOLNARD, R. W. et al. **Dissolvable strip for treatment of oral thermal burns**. n. WO2014070485 A1, 8 mai. 2014.
- MEHER, J. G. et al. cellulose buccoadhesive film bearing glimepiride: physicochemical characterization and biophysics of buccoadhesion. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 17, n. 4, p. 940-950, 2016.

MELÉNDEZ, P. A. et al. Thermal inkjet application in the preparation of oral dosage forms: Dispensing of prednisolone solutions and polymorphic characterization by solid-state spectroscopic techniques. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 97, n. 7 p. 2619-2636, 2008.

MENG-LUND, E. et al. Buccal absorption of diazepam is improved when administered in bioadhesive tablets—An in vivo study in conscious Göttingen mini-pigs. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 515, n. 1-2, p. 125-131, 2016.

MIDDHA, S. K.; USHA, T.; PANDE, V. HPLC evaluation of phenolic profile, nutritive content, and antioxidant capacity of extracts obtained from Punica granatum fruit pell. **Advances in Pharmacological Sciences**, Nova York, v. 2013, p. 1-6, 2013.

MISHRA, M. P. et al. N. *In vitro* antibacterial activity of crude extracts of 9 selected medicinal plants against UTI causing MDR bacteria. **Journal of King Saud University – Science**, Riade, v. 29, n. 1, p. 84-95, 2017.

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.

MONOSOL RX. MYERS, G. L.; HARIHARAN, M. **Orally administrable film dosage forms containing ondansetron**. n. US2011160264-A1. 30 jun. 2011.

MONTEEGRO-NICOLINE, M.; MIRANDA, V.; MORALES, J. O. Inkjet printing of proteins: an experimental approach. **The AAPS Journal**, Arlington, v. 19, n. 1, p. 234-243, 2017.

MORAES, J. O. et al. Scale-up of the production of cassava starch-based films using tape-casting. **Journal of Food Engineering**, Essex, v.119, p.800-808, 2013.

MORALES, J. O. et al. Films loaded with insulin-coated nanoparticles (ICNP) as potential platforms for peptide buccal delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v. 122, p. 38-45, 2014

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

MORAWIEC, T. et al. The biological activity of propolis-containing toothpaste on oral health environment in patients who underwent implant-supported prosthodontic rehabilitation. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2013, p. 1-12, 2013.

MURA, P. et al. Polymeric mucoadhesive tablets for topical or systemic buccal delivery of clonazepam: Effect of cyclodextrin complexation. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 152, n. 5, p. 755-763, 2016.

National Center Institute. **General Information About Lip and Oral Cavity Cancer**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/lip-mouth-treatment-pdq>. Acessado em: 12/02/2017

NAYAK, S. B. et al. Wound healing activity of the fruit skin of *Punica granatum*. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 16, n. 9, p. 857-861, 2013.

NU THERAPEUTICS PRIVATE LIMITED. RUDRA, V. S. et al. **Sublingual film of ketorolac**. n. WO2016151461. 29 set. 2016.

OKEKE, O. C.; BOATENG, J. S. Nicotine stabilization in composite sodium alginate based wafers and films for nicotine replacement therapy. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 155, p. 78-88, 2017.

OLEYAEI, S. A. et al. Modification of physicochemical and thermal properties of starch films by incorporation of TiO₂ nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 89, p. 256-264, 2016.

OLIVEIRA, R. B. et al. Topical anti-inflammatory activity of yacon leaf extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 23, n. 3, p. 497-505, 2013.

OLIVEIRA, R. N. et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 767-779, 2016.

PARK, Y. K. et al. Estudos de alguns componentes da própolis coletada por *Apis mellifera* no Brasil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 38, n. 4, p. 1253-1259, 1995.

PATEL, V. F.; LIU, F.; BROWN, M. B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 153, p. 106-116, 2011.

PEKOZ, A. Y. et al. Preparation and in-vivo evaluation of dimenhydrinate buccal mucoadhesive films with enhanced bioavailability. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Nova York, v. 42, n. 6, p. 916-925, 2016.

PEPPAS, N. A., SAHLIN, J. J. A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 169-172, 1989.

PERUMAL, V. A. et al. Formulation of monolayered films with drug and polymers of opposing solubilities. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 358, p. 184-191, 2008.

PETTI, S.; SCULLY, C. Polyphenols, oral health and disease: A review. **Journal of Dentistry**, Shiraz, v. 37, p. 413-423, 2009.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 63, p. 488-495, 2017.

PODCZECK, F. Gelatin. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 278-281

PRAKASAM, K.; BUKKA, R. Evaluation of cellulose polymers for buccal film formulation of rasagiline. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, India, v. 7, n. 3, 2014.

PREIS, M.; BREITKREUTZ, J.; SANDLER, N. Perspective: concepts of printing technologies for oral film formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 494, n. 2, p. 578-584, 2015.

PUREBRANDS LLC. GOLDBERG, M.; ARBIT, E. **Edible strips**. n. WO2013028333-A1. 28 fev. 2013.

QU, W.; PAN, Z.; MA, H. Extraction modeling and activities of antioxidants from pomegranate marc. **Journal of Food Engineering**, Londres, v. 99, p. 16-23, 2010.

RASOANAIVO, P. et al. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: Synergy and positive interactions. **Malaria Journal**, Londres, v. 10, n. suplemento 1, p. 1-12, 2011.

REDDY, P. C.; CHAITANYA, K. S. C.; RAO, Y. M. A review on bioadhesive buccal drug delivery systems: current status of formulation and evaluation methods. **Daru Journal of Pharmaceutical Sciences**, Teerã, v. 19, n. 6m p 385-403, 2011.

RISIO, S.; YAN, N. Piezoelectric Ink-Jet Printing of Horseradish Peroxidase: Effect of Ink Viscosity Modifiers on Activity. **Macromolecular rapid communications**, Oxford, v. 28, n. 18-19, p. 1934-1940, 2007.

ROGERS, T. L. Hypromellose. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 326-329.

SEDIGH-RAHIMABADI, M. et al. A tradicional mouthwash (*Punica granatum* var *pleniflora*) for controlling gingivitis of diabetic patients: A double-blind randomized controlled clinical trial. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, Thousand Oaks, v. 22, n. 1, p. 59-67, 2017.

SEERAM, N. P. et al. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Butterworths, v. 16, n. 6, p. 360-367, 2005.

SEOUL PHARMA CO. KIM, H. S. et al. **Orally disintegrating film preparation containing donepezil or pharmaceutically acceptable salt thereof, and preparation method therefor**. n. US20160184439. 30 jun. 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, Lausana, v. 133, n. 2, p. 253-260, 2011.

SHOJAEI, A. H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: A review. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, Edmonton, v. 1, n. 1, p. 15-30, 1998.

SILVA, J. A. T. et al. Pomegranate biology and biotechnology: A review. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 160, p. 85-107, 2013.

SILVESTRO, R. A. et al. Pomegranate extract mouth rinsing effects on saliva measures relevant to gingivitis risk. **Phytotherapy Research**, Londres, v. 23, n. 8, p. 1123-1127, 2009

SINGH, K. K. Carrageenan. In: ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. **Handbook of Pharmaceutical Expipients**. 6th ed. London: Pharmaceutical Press, 2009. p. 122-126.

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 Enzimology**, Nova York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SUDHAKAR, Y.; KUOTSU, K.; BANDYOPADHYAY, A. K. Buccal bioadhesive drug delivery — A promising option for orally less efficient drugs. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 114, p. 15-40, 2006.

SWEET, R. G. **Signal apparatus with fluid drop recorder**, U.S. Patent 3596275, 1971.

TEDESCO, M. P.; MONACO-LOURENÇO, C. A.; CARVALHO, R. A.
Gelatin/hydroxypropyl methylcellulose matrices — Polymer interactions approach for oral disintegrating films. **Materials Science and Engineering:C**, Amsterdam, v. 69, p. 668-674, 2016.

TEDESCO, M. P.; MONICA-LOURENÇO, C. A.; CARVALHO, R. A.
Characterization of oral disintegrating film of peanut skin extract—Potential route for buccal delivery of phenolic compounds. **Internatinal Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 97, p. 418-425, 2017.

TONGDEESOONTORN, W. et al. Water vapour permeability and sorption isotherms of cassava starch based films blended with gelatin and carboxymethyl cellulose. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, Istambul, v. 2, n. 4, p. 501-514, 2009.

TRANSTULLO, R. et al. Design and evaluation of buccal films as paediatric dosage form for transmucosal delivery of ondansetron. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Estugarda, v. 105, p. 115-121, 2016.

VARELAS, C. G.; DIXON, D. G.; STEINER, C. A. Zero-order release from biphasic polymer hydrogels. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 185-192, 1995.

VARONI, E. M. et al. Plant polyphenols and oral health: old phytochemicals for new fields. **Current Medicinal Chemistry**, Amsterdam, v. 19, n. 11, p. 1706-1720, 2012.

VILADOMIU, M. et al. Preventive and prophylactic mechanisms of action of pomegranate bioactive constituents. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, v. 2013, p. 1-18, 2013.

WAFA, B. A. et al. Antimicrobial effect of the Tunisian Nana variety *Punica granatum* L. extracts against *Salmonella enterica* (serovars Kentucky and Enteritidis) isolated from chicken meat and phenolic composition of its peel extract. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 241, p. 123-131, 2017.

WANG, C. et al. Optimization of extraction and enrichment of phenolics from pomegranate (*Punica granatum* L.) leaves. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 42, p. 587-594, 2013.

WU, V.; CHEN, W.; JIN, Q. Oral mucoadhesive buccal film of ciprofloxacin for periodontitis: preparation and characterization. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, Benin, v. 15, n. 3, p. 447-451, 2016.

XU, J. et al. Genipin-crosslinked catechol-chitosan mucoadhesive hydrogels for buccal drug delivery. **Biomaterials**, Guilford, v. 37, p. 395-404, 2015.

XU, Y. X. et al. Chitosan-Starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 21, p. 185-192, 2005.

YANG, F. et al. Synthesis, characterization, and applied properties of carboxymethyl cellulose and polyacrylamide graft copolymer. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 78, n. 1, p. 95-99, 2009.

ZAHIN, M.; AQUIL, F.; AHMAD, I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L. peel extracts. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 703, p. 99-107, 2010.

ZAREI, M.; AZIZI, M.; BASHIRI-SADR, Z. Studies on physic-chemical properties and bioactive compounds of six pomegranate cultivars grown in Iran. **Journal of Food Technology**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 112-117, 2010.

ZENG, N. et al. Poloxamer bioadhesive hydrogel for buccal drug delivery: Cytotoxicity and trans-epithelial permeability evaluations using TR146 human buccal epithelial cell line. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 495, n. 2, p. 1028-1037, 2015.

ZUPANČIČ, O. et al. Development, in vitro and in vivo evaluation of a self-emulsifying drug delivery system (SEDDS) for oral enoxaparin administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Estugarda, v. 109, p. 113-121, 2016.