



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS MUCOADESIVOS CONTENDO  
EXTRATO DE *ACHYROCLINE SATUREIODES* (LAM.) D. C. - MARCELA**

CARINE DAL PIZZOL

FLORIANÓPLIS - SC  
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**DESENVOLVIMENTO DE COMPRIMIDOS MUCOADESIVOS CONTENDO  
EXTRATO DE *ACHYROCLINE SATUREIODES* (LAM.) D. C. - MARCELA**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Farmácia  
como requisito parcial à obtenção  
do grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Angela Machado de Campos

Co-orientadora: Profa. Dra. Letícia Scherer Koester

CARINE DAL PIZZOL

FLORIANÓPOLIS - SC  
2009

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em primeiro lugar à Deus, pela vida e saúde. Por colocar em meu caminho mestres, amigos e seres humanos especiais e me ensinar a aprender com eles.

À minha orientadora, Profa. Dra. Angela Machado de Campos, por ter me dado a oportunidade de começar e, especialmente, por acreditar. Pela amizade, apoio, dedicação, carinho e confiança.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Letícia Scherer Koester, pela disponibilidade, estímulo, exemplo profissional e eterna boa vontade em ajudar.

Aos meus pais e meu irmão, por acreditarem nos meus sonhos, pelo amor, apoio e exemplo de perseverança em todos os momentos.

Aos professores Marcos A. Segatto e Flávio H. Reginatto pela colaboração ao disponibilizarem recursos dos seus laboratórios e por seus ensinamentos.

Aos funcionários do laboratório de Farmacotécnica, Sandra e Nilson, pela amizade, carinho e ajuda durante a realização do trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Farmacotécnica e Controle de Qualidade pela amizade, colaboração e bons momentos de convivência.

Às minhas queridas amigas que me acompanharam nessa caminhada e me compreenderam: Cláudia, Francielly, Juliana, Tatiany, Daniela, Cristiana e Letícia.

## RESUMO

As propriedades fitoquímicas e farmacológicas da *Achyrocline satureioides*, marcela, espécie nativa da América do Sul, vêm sendo estudadas há mais de duas décadas. Devido aos resultados interessantes obtidos, diversos estudos visando o desenvolvimento galênico de produtos fitoterápicos aproveitando o potencial terapêutico demonstrado por esta planta vêm sendo conduzidos. Neste sentido, um extrato seco nebulizado da planta foi desenvolvido e otimizado, possibilitando o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas. Este extrato foi recentemente avaliado quanto à atividade frente ao HSV-1 e apresentou-se promissor para o tratamento do Herpes simples. Considerando o exposto, este trabalho teve por objetivo o desenvolvimento e a avaliação de comprimidos mucoadesivos contendo o extrato seco previamente desenvolvido visando ao tratamento bucal do Herpes simples. Para isso, o ESN foi caracterizado quanto aos teores de umidade e de quercetina (marcador químico), apresentando valores de  $2,47\% \pm 0,06$  e  $18,80 \text{ mg/g} \pm 0,07$ , respectivamente. Os excipientes, Carbopol<sup>®</sup>, quitosana e hidroxipropilmetilcelulose, polímeros hidrofílicos com características distintas (iônico, catiônico e não-iônico) e o estearato de magnésio (lubrificante), foram caracterizados quanto ao teor de umidade e identificados por espectroscopia de infravermelho. Após isso, foi realizado um delineamento experimental para avaliar as formulações obtidas a partir de misturas de ESN com os polímeros ou suas blendas, sendo estudadas suas características tecnológicas visando à obtenção de comprimidos por compressão direta. No entanto, as misturas apresentaram fluxo e compactabilidade inadequadas. Assim, um segundo delineamento experimental foi traçado, e o método de granulação por via seca foi estabelecido, produzindo comprimidos com propriedades físicas adequadas. As formulações elaboradas foram avaliadas quanto às propriedades físicas, químicas e físico-químicas, sendo todas consideradas aprovadas segundo os critérios da Farmacopéia Brasileira (1988). Uma metodologia por CLAE foi desenvolvida e validada a fim de estabelecer com segurança o teor do marcador químico nos comprimidos. Em seguida, foram avaliados o intumescimento e erosão *in vitro* das matrizes. A partir desses resultados, inseridos no *software*, uma formulação otimizada foi proposta, a qual foi também caracterizada. A formulação otimizada apresentou propriedades físicas, químicas e físico-químicas adequadas, e valores de intumescimento (76,16 % em 8h) e erosão (5,42 % em 8 h) satisfatórios, conforme previsto pelo delineamento. A seguir, tanto a formulação otimizada quanto as demais foram avaliadas quanto ao tempo de mucoadesão, que foi considerado satisfatório e depende das características estruturais dos diferentes polímeros. Por fim, todas as formulações foram avaliadas quanto ao perfil e cinética de liberação *in vitro* de quercetina, empregando-se o método de cubas com agitação de cesta. A maioria das formulações apresentou uma liberação bastante prolongada do marcador, cuja cinética foi caracterizada como de primeira ordem, ou seja, dependente da quantidade de flavonóide remanescente na matriz. A liberação da quercetina a partir da formulação otimizada também foi prolongada (cerca de 50,19 % em 24 h) e obedeceu a uma cinética de ordem zero, ou seja, independente da quantidade remanescente na matriz.

**Palavras-chave:** *Achyrocline satureioides*, marcela, comprimidos mucoadesivos, polímeros bioadesivos, Herpes simples, liberação bucal.

## ABSTRACT

### **Development of mucoadhesive buccal tablets containing spray dried extract of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. – Marcela**

The phytochemical and pharmacological properties of *Achyrocline satureioides* (marcela), a native specimen found in South America, have been extensively studied over two decades. Due to the results obtained so far, several studies concerning the development of phyto products have been conducted and take advantage of the therapeutical potential shown by this herb. Therefore, a spray dried plant extract was developed and optimized, which made possible the development of solid dosage forms. The activity of such extract against HSV-1 was recently evaluated and was found promising for the treatment of Herpes simples. Considering these facts, the objective of this work was to develop and evaluate mucoadhesive tablets containing the spray dried extract previously developed aiming to the buccal treatment of Herpes simples. In this regard, this research focuses on the development and the mucoadhesive tablet evaluation containing a dry extract previously developed aiming to the buccal treatment of the Herpes simples. For this, the ESN was characterized by humidity content and quercetin content (chemical marker), presenting values of  $2,47\% \pm 0,06$  and  $18,80 \text{ mg/g} \pm 0,07$ , respectively. The excipients, Carbopol<sup>®</sup>, chitosan and hydroxypropylmethylcellulose, which are hydrophilic polymers with distinct characteristics (anionic, cationic and non-ionic) as well as magnesium stearate (lubricant), have been characterized by humidity content and identified by infrared spectroscopy. After this, an experimental design was carried out in order to evaluate the formulations produced from mixtures of ESN with either polymers or their blends, and their technological properties were evaluated aiming to obtain tablets by direct compression. However, the mixtures presented inadequate flow and compactability. Thus, a second experimental design was planned, and the use of dry granulation was established, leading to tablets with satisfactory physical properties. The formulations were evaluated concerning physical, chemical physicochemical properties, being all considered approved according to the criteria of the Brazilian Official Pharmacopoeia (1988). An HPLC method was developed and validated in order to establish with security the chemical marker content in tablets. After that, the matrices were characterized with respect to swelling and erosion *in vitro*. From these results, inserted in the software, an optimized formularization was suggested, which also was characterized. This optimized formulation presented acceptable physical, chemical and physicochemical properties, as well as satisfactory swelling (76,16 % em 8h) and erosion (5,42 % em 8 h) values, which matched those predicted by the software. Thus, the optimized formulation, as well as the other tablets, were evaluated with respect to the mucoadhesive properties, which were found satisfactory and dependent on the polymers structural characteristics. Finally, all formulations were evaluated with regard to the *in vitro* release profile and kinetics of quercetin, by employing the basket method. Most of the formulations displayed a prolonged release of the chemical marker, and the release kinetics was classified as first order, that is, the release was found dependent on the flavonoid amount remaining in the matrix. The release of quercetin from the optimized formulation was also prolonged (around 50,19 % over 24 h) and followed a zero order kinetics, that is, it was independent on the amount remaining in the matrix.

**Keywords:** *Achyrocline Satureioides*; marcela; mucoadhesive tablets; bioadhesive polymers; Herpes simples; Buccal drug delivery

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química da quercetina .....	20
<b>Figura 2:</b> Estrutura química do HPMC.....	26
<b>Figura 3:</b> Estrutura química da Quitosana.....	27
<b>Figura 4:</b> Estrutura química do Carbopol® .....	28
<b>Figura 5:</b> Aparelho para determinação do ângulo de repouso .....	43
<b>Figura 6:</b> Volúmetro de compactação.....	44
<b>Figura 7:</b> Perfil cromatográfico do ESN de <i>Achyroclines saturoioides</i> em CLAE.. ...	60
<b>Figura 8:</b> Espectro na região do infravermelho do Estearato de Magnésio.....	61
<b>Figura 9:</b> Espectro na região do infravermelho do Carbopol® .....	62
<b>Figura 10:</b> Espectro na região do infravermelho do HPMC .....	63
<b>Figura 11:</b> Espectro na região do infravermelho da Quitosana .....	63
<b>Figura 12:</b> Sistema de seleção dos pontos das blendas dos polímeros.....	71
<b>Figura 13:</b> Aspecto macroscópico dos comprimidos de <i>Achyrocline saturoioides</i> obtidos por granulação via seca.....	75
<b>Figura 14:</b> Curva de calibração média de Quercetina obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta. ....	78
<b>Figura 15:</b> Cromatograma típico obtido por CLAE da mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos .....	79
<b>Figura 16:</b> Cromatograma da mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos adicionado de 20 µg de quercetina .....	80

<b>Figura 17:</b> Aparência dos comprimidos após submetidos ao intumescimento por 8 horas .....	83
<b>Figura 18:</b> Perfil de Intumescimento das formulações em saliva artificial.....	84
<b>Figura 19:</b> Comprimidos após serem submetidos ao ensaio de caracterização da erosão por 8 h .....	86
<b>Figura 20:</b> Perfil de Erosão dos comprimidos em saliva artificial.....	87
<b>Figura 21:</b> Perfil de Intumescimento em saliva artificial da formulação otimizada....	89
<b>Figura 22:</b> Perfil de Erosão da formulação otimizada em saliva artificial .....	90
<b>Figura 23:</b> Tempo de mucoadesão dos comprimidos em contato com o esôfago de porco .....	91
<b>Figura 24:</b> Curva de calibração média da quercetina obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta. ....	95
<b>Figura 25:</b> Cromatograma típico obtido por CLAE do meio de dissolução .....	96
<b>Figura 26:</b> Perfil de dissolução do marcador químico nas formulações (DPR < 13,82% no primeiro ponto e DPR < 8,47% nos demais pontos).....	100

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b> Excipientes empregados na produção dos comprimidos mucoadesivos bucais de <i>Achyrocline satureioides</i> e suas funções .....	42
<b>Quadro 2:</b> Formulação otimizada proposta pelo <i>software</i> .....	88
<b>Quadro 3:</b> Características da formulação otimizada.....	89



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Teor de umidade dos excipientes utilizados para a confecção dos comprimidos .....	64
<b>Tabela 2:</b> Delineamento experimental 1 .....	66
<b>Tabela 3:</b> Resultados da caracterização tecnológica das formulações .....	67
<b>Tabela 4:</b> Delineamento experimental 2 .....	72
<b>Tabela 5:</b> Rendimento (%) da operação da granulação via Seca das Formulações	73
<b>Tabela 6:</b> Resultados da caracterização das formulações .....	74
<b>Tabela 7:</b> Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de quercetina por CLAE (n=3). .....	77
<b>Tabela 8:</b> Valores experimentais médios obtidos durante o estudo da precisão do método (n=6) .....	79
<b>Tabela 9:</b> Valores de recuperação (%) obtidos após adicionar diferentes concentrações de quercetina ( $\mu\text{g/mL}$ ) em uma mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos (n=3) .....	80
<b>Tabela 10:</b> Teor de quercetina nas formulações obtidos por CLAE.....	81
<b>Tabela 11:</b> Valores experimentais obtidos na avaliação da influência do filtro .....	93
<b>Tabela 12:</b> Solubilidade da Quercetina nos meios avaliados .....	94
<b>Tabela 13:</b> Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de quercetina por CLAE (n=3) .....	95
<b>Tabela 14:</b> Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução .....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
ANOVA	Análise de variância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CP	Carbopol®
CS	Quitosana
°C	Grau Celsius
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
ESN	Extrato seco nebulizado
Est. Mg	Estearato de Magnésio
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulose
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IV	Infravermelho
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MG	Miligrama
mL	Mililitro
p/p	Peso por peso
v/v	Volume por volume
R <sup>2</sup>	Coefficiente de regressão
RPM	Rotações por minuto
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
pH	Potencial de hidrogênio iônico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1 <i>Achyrocline satureioides</i></b>	<b>18</b>
2.1.1 Atividades farmacológicas	18
2.1.2 Composição Química	18
2.1.3 Desenvolvimento Tecnológico	20
<b>2.2 A via bucal de administração de fármacos</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Sistemas mucoadesivos</b>	<b>23</b>
2.3.1 Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)	25
2.3.2 Quitosana	26
2.3.3 Carbopol®	27
<b>2.4 Comprimidos mucoadesivos</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Compressão</b>	<b>29</b>
2.5.1 Compressão Direta	29
2.5.2 Granulação	30
2.5.2.1 Granulação por via seca	30
2.5.2.2 Granulação por via úmida	31
<b>2.6 Herpes Simples (HSV)</b>	<b>31</b>
2.6.1 Herpes Labial	32
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>36</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b>	<b>36</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>4.1 MATERIAIS</b>	<b>38</b>
4.1.1 Extrato vegetal	38
4.1.2 Matérias-primas	38
4.1.3 Solventes e reagentes	38
4.1.4 Equipamentos e utensílios	39
4.1.5 Material biológico	40
<b>4.2 MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.2.1 Caracterização das matérias-primas	40
4.2.1.1 Caracterização do Extrato Seco Nebulizado (ESN)	40
4.2.1.1.1 Teor de umidade	40
4.2.1.1.2 Quantificação do teor de Marcador Químico no ESN por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Quercetina	41
4.2.1.2 Caracterização dos excipientes	41

4.2.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho (IV).....	42
4.2.1.2.2 Teor de umidade .....	42
4.2.2 Estudo de formulação 1: avaliação das características tecnológicas das misturas de excipientes.....	42
4.2.2.1 Delineamento experimental.....	42
4.2.2.2 Caracterização tecnológica das formulações: fluxo e compressibilidade .....	43
4.2.2.2.1 Determinação do Ângulo de Repouso.....	43
4.2.2.2.2 Determinação das densidades bruta e de compactação.....	44
4.2.2.2.3 Fator de Hausner (FH) .....	44
4.2.2.2.4 Índice de compressibilidade (IC) .....	45
4.2.2.2.5 Compactabilidade das misturas .....	45
4.2.3 Estudo de formulação 2: preparação de comprimidos a partir de granulados..	46
4.2.3.1 Delineamento experimental.....	46
4.2.3.1.1 Granulação Via Seca.....	46
4.2.4 Caracterização dos comprimidos .....	47
4.2.4.1 Avaliação da aparência e dimensões .....	47
4.2.4.2 Peso médio.....	47
4.2.4.3 Dureza .....	48
4.2.4.4 Friabilidade .....	48
4.2.4.5 Teor de marcador químico nos comprimidos.....	48
4.2.4.5.1 Preparação das amostras de comprimidos para análise.....	48
4.2.5 Validação do método de doseamento do marcador químico nos comprimidos	49
4.2.5.1 Condições Cromatográficas .....	49
4.2.5.2 Curva Padrão .....	50
4.2.5.3 Precisão.....	50
4.2.5.4 Especificidade .....	50
4.2.5.5 Exatidão.....	50
4.2.5.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) .....	51
4.2.6 Características de intumescimento e erosão dos comprimidos.....	52
4.2.6.1 Avaliação do intumescimento dos comprimidos .....	52
4.2.6.2 Avaliação da erosão dos comprimidos .....	52
4.2.7 Tempo de mucoadesão <i>in vitro</i> .....	53
4.2.8 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> .....	53
4.2.8.1 Validação do método de dissolução dos comprimidos .....	53
4.2.8.1.1 Condições Cromatográficas .....	53
4.2.8.1.2 Avaliação da influência do filtro .....	54
4.2.8.1.3 Determinação da solubilidade de quercetina em diferentes meios de dissolução.....	54
4.2.8.1.4 Linearidade.....	54
4.2.8.1.5 Especificidade frente à composição do meio de dissolução.....	54
4.2.8.1.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) .....	55
4.2.8.2 Estudo da cinética de liberação .....	55
4.2.8.3 Avaliação matemática dos perfis .....	55

4.2.9 Análise estatística .....	56
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>5.1 Caracterização das matérias-primas</b> .....	<b>58</b>
5.1.1 Caracterização do Extrato Seco Nebulizado (ESN) .....	58
5.1.1.1 Teor de umidade do Extrato Seco Nebulizado .....	58
5.1.1.2 Quantificação do teor do Marcador Químico no ESN –Quercetina .....	58
5.1.2 Caracterização dos Excipientes .....	60
5.1.2.1.1 Estearato de Magnésio.....	61
5.1.2.1.2 Carbopol® .....	62
5.1.2.1.3 Hidroxipropilmetilcelulose.....	62
5.1.2.1.4 Quitosana.....	63
5.1.2.2 Teor de umidade .....	64
<b>5.2 Delineamento experimental 1, visando a preparação de comprimidos por compressão direta</b> .....	<b>64</b>
5.2.1 Caracterização tecnológica das formulações: fluxo e compressibilidade.....	66
<b>5.3 Delineamento experimental 2, visando a preparação de comprimidos por granulação via seca</b> .....	<b>70</b>
5.3.1 Caracterização dos comprimidos .....	74
5.3.1.1 Teor de quercetina nos comprimidos.....	76
5.3.2 Validação da metodologia para o doseamento do marcador químico nos comprimidos.....	77
<b>5.4 Características de intumescimento e erosão dos comprimidos.....</b>	<b>82</b>
<b>5.5 Caracterização da formulação otimizada.....</b>	<b>88</b>
<b>5.6 Tempo de mucoadesão <i>in vitro</i>.....</b>	<b>90</b>
<b>5.7 Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i>.....</b>	<b>92</b>
5.7.1 Validação do método de dissolução dos comprimidos.....	92
5.7.1.1 Avaliação da influência do filtro .....	93
5.7.1.2 Determinação da solubilidade de quercetina em diferentes meios de dissolução .....	93
5.7.1.3 Linearidade.....	94
5.7.1.5 Limite de quantificação e Detecção.....	96
5.7.2 Determinação do perfil e avaliação da cinética de liberação do marcador químico a partir dos comprimidos.....	96
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	<b>103</b>
<b>6 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>106</b>
<b>7 APÊNDICES</b> .....	<b>118</b>

## 1 INTRODUÇÃO

---

A pesquisa voltada ao desenvolvimento galênico vem direcionando esforços para a obtenção de formas farmacêuticas eficientes, seguras e, sobretudo, mais confortáveis ao paciente, utilizando mecanismos que permitam o controle da liberação do fármaco e a adequação a vias de administração alternativas à via oral. Neste sentido, os sistemas bioadesivos têm-se mostrado uma alternativa interessante para liberação de fármacos pelas vias transdérmica e transmucosa e, entre as mucosas, a da cavidade bucal é considerada a mais conveniente e de fácil acesso. A liberação de agentes terapêuticos através de dispositivos de liberação aderidos à cavidade bucal, tanto visando efeitos locais como sistêmicos, é uma opção promissora devido às características biofarmacêuticas favoráveis desta via de administração. Além disso, este tipo de forma farmacêutica é auto-administrável, de baixo custo e agradável ao paciente (SUDHAKAR; KOUTSU; BANDYOPADHYAY, 2006).

Outro segmento da pesquisa farmacêutica em nível mundial que vem crescendo exponencialmente nos últimos anos, interesse este traduzido pelo crescente investimento nesta área, é o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. Este crescimento é estimado em 10% a 20% ao ano e as principais razões que impulsionaram esse grande crescimento nas últimas décadas foram a valorização de uma vida de hábitos mais saudáveis e, conseqüentemente, o consumo de produtos naturais, a descoberta de novos princípios ativos nas plantas e a comprovação científica da atividade de fitoterápicos (SOUSA; MIRANDA, 2009).

A imensa biodiversidade de nossa flora nativa tem potencial para colocar o Brasil na linha de frente deste segmento da indústria farmacêutica, mas, para isso é necessário que a espécie em questão seja profundamente estudada com base em critérios científicos. Dentro deste contexto, entre as espécies nativas da Região Sul do Brasil, encontra-se a *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., planta que vem sendo amplamente estudada no que diz respeito à composição química, potencialidades terapêuticas e toxicidade, bem como estudos tecnológicos que possibilitaram a obtenção de um extrato seco padronizado a partir do qual formas farmacêuticas finais podem ser obtidas.

A potencial aplicação de *Achyrocline satureioides* no tratamento do Herpes simples foi evidenciada recentemente pelo estudo de Bettega e colaboradores (2004), que avaliaram a atividade antiviral *in vitro* de extratos secos padronizados obtidos a partir de um extrato hidroetanólico rico em flavonóides.

As infecções virais constituem um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Particularmente, o herpes labial se caracteriza por uma condição bastante incômoda e o tratamento de primeira escolha é o uso tópico de formulações contendo antivirais (BRADY; BERNSTEIN, 2004; DREW, 2004).

Aliando estas tendências, o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico constituído por um comprimido mucoadesivo contendo extrato seco de marcela parece ser uma alternativa interessante para o tratamento bucal do herpes simples.



## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2.1 *Achyrocline satureioides*

“Marcela” *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Asteraceae, conhecida popularmente como “marcela”, é uma planta medicinal que tem sido utilizada na medicina popular na Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (SIMÕES et al, 1986). Esta espécie foi descrita detalhadamente na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (1928). Em 2001, sua monografia foi atualizada e incluída na quarta edição da Farmacopéia Brasileira.

### 2.1.1 Atividades farmacológicas

Extratos aquosos e alcoólicos preparados a partir de diferentes partes de *Achyrocline satureioides*, especialmente das inflorescências secas, vêm sendo avaliados quanto à sua atividade farmacológica. Por meio de estudos *in vitro*, foram identificadas as atividades antiespasmódica (SIMÕES et al., 1988a), antimicrobiana (CALVO et al., 2006), antioxidante (GUGLIUCCI; MENINI, 2002, POLYDORO et al., 2004;), citoprotetora (ARREDONDO et al., 2004), imunomodulatória (SANTOS et al., 1999; COSENTINO et al., 2008), hipoglicemiante (CARNEY et al., 2002) e anti-herpética (BETTEGA et al., 2004).

Em estudos *in vivo* foram identificadas atividades sedativa (SIMÕES et al., 1988a), antiinflamatória (SIMÕES et al., 1988b), hepatoprotetora (KADARIAN et al., 2002), relaxante muscular (HNATYSZUN et al., 2004), fotoprotetora (MORQUIO; RIVERA-MEGRET; DAJAS, 2005) e gástrica (SIMÕES et al., 1988a).

### 2.1.2 Composição Química

A composição química de *Achyrocline satureioides* foi extensivamente estudada por diversos pesquisadores, sendo relatada a presença de monoterpenóides do óleo essencial; ácidos cafeico, clorogênico e isoclorogênico e seus ésteres; outros terpenóides, compostos acetilênicos, derivados da kawapirona, polissacarídeos e minerais (AKISUE, 1971; BOHLMANN; BURKHARDT; ZDERO,

1973; MESQUITA; CORREA; PADUA, 1986; BROUSSALIS et al., 1988; LAMATY et al.; 1991; PETROVICK; ORTEGA; BASSANI, 1997).

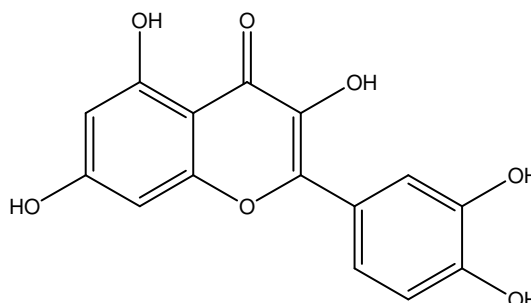
Estes estudos demonstraram que os flavonóides quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina são os principais constituintes da fração etanólica do extrato obtido das inflorescências da marcela (FERRARO; NORBEDO; COSSIO, 1981; SIMÕES, 1984) e possuem relação com as principais atividades farmacológicas atribuídas a esta planta.

Os flavonóides são polifenóis potencialmente bioativos presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de vegetais. O termo flavonóides engloba um grupo de compostos polifenólicos complexos que apresentam uma estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel C) (WILHELM FILHO; DA SILVA; BOVERIS, 2001). Estes compostos são frequentemente utilizados tanto como marcadores taxonômicos como marcadores químicos no desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, em razão de sua já citada abundância, grande especificidade em algumas espécies, relativa facilidade de identificação, relativa estabilidade e acúmulo em determinados órgãos vegetais, que sofre menor influência do meio ambiente (ZUANAZZI; MONTANHA, 2003).

Segundo definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) (BRASIL, 2004), um marcador químico é um componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal, idealmente o próprio princípio ativo e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos. Nos estudos tecnológicos já realizados com *Achyrocline satureioides*, os flavonóides, em especial a quercetina, vêm sendo utilizados como marcadores químicos.

A quercetina (3,3',4',5,7 – pentaidróxi-flavona), representada na figura 1, é um flavonol, pertencente à classe dos flavonóides, que possui uma extensa distribuição no reino vegetal. Apresenta sensibilidade à luz (HARBORNE; WILLIAMS, 2000) e

sua estabilidade em solução torna-se comprometida em valores de pH acima de 7, condição na qual as reações de oxidação e hidrólise tornam-se favorecidas (GOMATHI et al., 2003).



**Figura 1:** Estrutura química da quercetina

### 2.1.3 Desenvolvimento Tecnológico

O desenvolvimento tecnológico de extratos de *Achyrocline satureioides*, com o intuito de obter um medicamento fitoterápico, iniciou-se em 1987 por Sonaglio com a padronização de soluções extrativas hidroalcoólicas e o estabelecimento de metodologias para o controle de qualidade da matéria-prima e do produto acabado. Nesta etapa, foram definidos parâmetros como o tipo de solvente, razão matéria-prima/solvente, método extrativo e tempo de extração.

Bassani (1990) estudou a aplicação da técnica de filtração tangencial sobre membrana de osmose inversa no desenvolvimento de extratos de baixo teor etanólico de *Achyrocline satureioides*, a partir de soluções extrativas hidroetanólicas padronizadas por Sonaglio (1987). Nestes estudos foi observada a eliminação de uma fração de baixa polaridade durante a etapa de desalcoolização. Este fato explica a perda importante dos flavonóides presentes e a obtenção de uma solução desalcoolizada límpida. No entanto, evidenciou a viabilidade da preparação do produto seco por *spray-drying* (nebulização), através da adição de adjuvantes de nebulização.

Este conjunto de dados direcionou os estudos visando à otimização das condições de preparação de extratos secos nebulizados, de forma a evitar a perda da fração de menor polaridade. Lemos-Senna e colaboradores (1997)

desenvolveram extratos de baixo teor etanólico de *Achyrocline satureioides*, em evaporador rotatório, utilizando polissorbato 80 a 2 % (p/p) como adjuvante.

Teixeira (1996), aprofundando estes estudos, avaliou a influência da natureza de adjuvantes tecnológicos: dióxido de silício coloidal, celulose microcristalina e  $\beta$ -ciclodextrina sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* preparados com um teor de 50 % (p/p) desses adjuvantes de secagem. Neste trabalho ficou evidenciado que o produto seco contendo dióxido de silício coloidal como adjuvante apresentou melhores características tecnológicas. Este estudo deu origem ao extrato seco nebulizado utilizado no presente trabalho.

Paralelamente, foram desenvolvidas preparações semi-sólidas utilizando soluções extrativas de *Achyrocline satureioides* concentradas na presença de agentes tensoativos (PETROVICK; KNORST, 1991).

Continuando estes estudos, De Paula e colaboradores (1998) incorporaram o extrato seco nebulizado em uma forma farmacêutica semi-sólida numa proporção de 20% (m/m). A preparação mostrou-se tecnologicamente viável, porém o alto teor de sólidos inserido na matriz semi-sólida resultou na obtenção de uma pasta e não permitiu o estudo da liberação dos flavonóides.

Em 2001, o processo de obtenção de um produto seco de *Achyrocline satureioides* foi objeto de pedido de patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (BASSANI et al., 2001).

De Souza e colaboradores (2002) constataram que os teores de flavonóides presentes nas soluções extrativas hidroetanólica 40 e 80% (v/v) são muito semelhantes, o que constitui uma vantagem do ponto de vista econômico no processo de desalcoolização, etapa prévia à secagem por nebulização. No mesmo estudo, foi observado que a ausência de  $\beta$ -ciclodextrina aumenta o rendimento da operação e que a presença de dióxido de silício coloidal torna-se imprescindível para a obtenção dos diferentes extratos.

Da Silva (2003) propôs o desenvolvimento do produto seco de *Achyrocline satureioides* em escala piloto, bem como a incorporação deste em bases semi-sólidas, hidrofílica e lipofílica, com posterior estudo *in vitro* para a avaliação do perfil de liberação dos flavonóides. Os resultados demonstraram que os flavonóides possuem uma maior afinidade pela base lipofílica, resultando na retenção completa do marcador químico (3-O-metilquercetina) pela base, assim, esta formulação foi abandonada. A formulação hidrofílica resultou em uma reduzida liberação do marcador químico (3-O-metilquercetina). Esses resultados foram relacionados com a viscosidade dos sistemas obtidos devido ao elevado teor de sólidos.

Petrovick (2006) estudou dois métodos de granulação a partir de produto seco de *Achyrocline satureioides* obtido por nebulização, com posterior revestimento, em escala semi-industrial, visando superar as principais limitações tecnológicas, como higroscopia excessiva do produto, baixa densidade, pequeno tamanho de partícula e instabilidade dos constituintes flavonoídicos frente à luz. A granulação por via seca possibilitou a obtenção de um produto com propriedades favoráveis à compressão.

Recentemente, Holzschuh e colaboradores (2007) realizaram um estudo de fotoestabilidade e estabilidade térmica para o ESN. Nesse estudo, constataram a manutenção da estabilidade por nove meses em condições normais de armazenamento (temperatura:  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ; umidade relativa:  $60 \pm 5\%$ ).

## **2.2 A via bucal de administração de fármacos**

A via bucal vem despertando recentemente um considerável interesse como via alternativa para a administração sistêmica de fármacos, devido a propriedades que a tornam vantajosa com respeito a outras vias de administração. As principais vantagens relacionadas a esta via são: (i) evita o efeito de primeira passagem hepática da via oral, além da atividade enzimática ser significativamente menor que em outras vias mucosas; (ii) fácil acesso, possibilitando uma colocação precisa do dispositivo de liberação do fármaco, além de permitir sua retirada quando necessário; (iii) permite a modificação da permeabilidade local do tecido ou, inclusive, a inibição da atividade proteásica; (iv) boa aceitação por parte do paciente;

(v) é considerada menos suscetível que outras mucosas a irritações ou danos importantes devido à forma de dosificação, fármaco ou excipientes, já que devido à sua função, está habitualmente exposta a uma grande quantidade de substâncias exógenas, além de possuir renovação celular extremamente rápida, o que permite o emprego de promotores de absorção; (vi) é uma mucosa altamente vascularizada, permitindo que, após a penetração, o fármaco chegue rapidamente à circulação sanguínea (HARRIS; ROBINSON, 1992; SUNDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHAYAY, 2006; ROSSI; SANDRI; CAMELLA, 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008):

Por outro lado, as desvantagens associadas a esta via de administração também estão associadas as suas características anatômico-funcionais: (i) produção constante de saliva (1,5 a 2 litros/dia), que pode conduzir ao arraste e ingestão involuntária do dispositivo de liberação, resultando em absorção oral; (ii) a elevada motilidade como consequência da fala e da mastigação; (iii) as exigências de características organolépticas adequadas, restringindo a disponibilidade de excipientes; (iv) a espessura da mucosa e seu caráter lipídico que limitam fortemente a permeabilidade, especialmente a moléculas hidrofílicas e de peso molecular elevado. Desta forma, formas farmacêuticas convencionais não são capazes de assegurar níveis terapêuticos de fármaco tanto na mucosa como na circulação (HARRIS; ROBINSON, 1992; MIZRAHI; DOMB, 2008).

Assim, para obter uma ação terapêutica adequada a partir de uma administração bucal, é necessário o prolongamento do tempo e o aumento da intensidade do contato entre o fármaco e a mucosa. Consequentemente, é desejável que uma forma farmacêutica destinada a este tipo de administração apresente boas propriedades adesivas e um eficiente controle de liberação do fármaco, característicos dos sistemas mucoadesivos.

### **2.3 Sistemas mucoadesivos**

O uso de estruturas mucoadesivas como sistemas de liberação de fármacos vem sendo considerada uma estratégia bastante interessante para melhorar a

administração de fármacos via bucal (VARSHOSAZ; DEGHAN, 2002; PERIOLI et al., 2004; MOHAMMADI-SAMANI; BAHRI-NAJAFI; YOUSEFI, 2005). Estes sistemas, geralmente poliméricos, apresentam a capacidade de aderir-se à superfície das células de epitélios ou da camada de muco que os recobre. O principal atrativo de utilização de polímeros bioadesivos na elaboração de sistemas de liberação de fármacos reside nas propriedades que outorgam aos mesmos: prolongamento do tempo de residência no lugar de absorção, intensificação do contato com a mucosa resultando em um gradiente de concentração que favorece a absorção do fármaco, localização do sistema em uma zona específica, possibilidade de utilização de promotores de permeação. Todas estas propriedades se traduzem, via de regra, na melhora da biodisponibilidade ou no efeito da molécula ativa.

Polímeros mucoadesivos são geralmente macromoléculas hidrofílicas contendo numerosos grupos funcionais, nomeadamente carboxilas, hidroxilas, amidas, aminas, capazes de interagir através de pontes de hidrogênio com as estruturas da mucosa e que, em contato com soluções aquosas, tendem a hidratar e intumescer. Com a hidratação, esses adquirem propriedades adesivas, mas quando essa é excessiva resulta na formação de uma mucilagem escorregadia, diminuindo a capacidade de adesão (AMEYE et al., 2002; CHIAPPETTA et al., 2006; MORTAZAVI, 1995).

Esses sistemas devem ser biocompatíveis, farmacológica e quimicamente inertes, não irritantes, não alergênicos, não-absorvíveis, bioadesivos e de baixo custo (SENEL; HINCAL, 2001; MOHAMMADI-SAMANI; BAHRI-NAJAFI; YOUSEFI, 2005).

Diferentes situações para mucoadesão são possíveis, dependendo do tipo de formulação desejada. No caso de formulações secas ou parcialmente hidratadas, a hidratação do polímero e o intumescimento provavelmente desempenham um papel chave (ROSSI; SANDRI; CARAMELLA, 2005). A hidratação do polímero e a consequente desidratação do muco causam um aumento das propriedades coesivas que promovem a mucoadesão. O intumescimento pode favorecer a flexibilidade das cadeias poliméricas e a interpenetração entre estas e as cadeias de mucina. O



coeficiente de espalhamento e a capacidade de formar ligações químicas ou físicas com a mucina aumentam com a hidratação da forma farmacêutica (DUCHÊNE; PONCHEL, 1997; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

Os polímeros carregados são mais interessantes para o intumescimento, pois as cargas no interior do polímero levam a uma concentração iônica da trama polimérica, criando uma pressão osmótica que facilita a entrada de água no interior desta malha. Também ocorrem ligações interfaciais entre as cadeias interpenetradas (DUCHÊNE; PONCHEL, 1997).

Essas ligações são interações entre os mucoadesivos e a mucosa, e ocorrem através de forças intermoleculares repulsivas ou atrativas, como forças eletrostáticas que, nesse caso, possuem menor contribuição, forças repulsivas estéricas, interações hidrofóbicas, ligações covalentes e forças de hidratação. As interações atrativas compreendem forças fracas, como interação de Van der Waals, **ou** interações fortes, como ligações covalentes. Já as interações repulsivas ocorrem através das interações eletrostáticas ou interações estéricas (SMART, 2005; SUDHAKAR; KOUTSU; BANDYOPADHYAY, 2006).

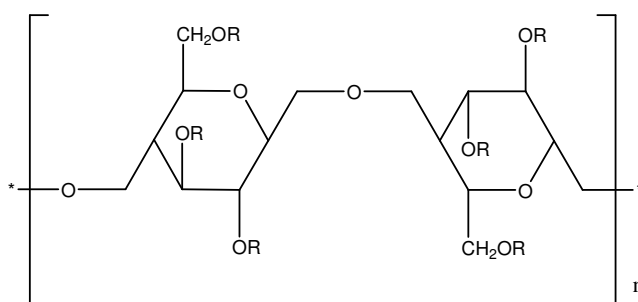
Portanto, dependendo do tipo de formulação, polímeros com diferentes características devem ser utilizados. Entre as diversas classes de polímeros que apresentam boas propriedades de bioadesão encontram-se os derivados de celulose (ex: hidroxipropilmetilcelulose), os derivados do ácido poliacrílico (ex: Carbopol<sup>®</sup>) e os polissacarídeos (ex: quitosana) (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005, SMART, 2005; MAKHOLOF; WERLE; TAKEUCHI, 2008).

### **2.3.1 Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)**

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), cuja estrutura química está representada na figura 2, é um polímero de caráter hidrofílico, não iônico, biocompatível, biodegradável, não tóxico, possuindo capacidade de incorporar elevadas quantidades de substâncias ativas (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005, LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Este polímero tem sido amplamente utilizado em formulações farmacêuticas orais como aglutinante, agente de revestimento e formador de matriz de liberação prolongada em comprimidos, devido a sua natureza não tóxica e propriedades de intumescimento (CHIAPPETTA et al., 2006). No que se refere à sua aplicação em sistemas de liberação modificada, a capacidade de intumescimento é uma das características mais importantes desse polímero, uma vez que exerce efeito pronunciado na cinética de liberação do fármaco incorporado (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Mohammadi-Samani e colaboradores (2005) em estudo visando avaliar a influência de diferentes polímeros sobre a liberação da prednisolona a partir de comprimidos bucais mucoadesivos, observaram que o peso molecular da HPMC influencia na capacidade de mucoadesão, sendo que apresentaram comportamentos mais eficientes os polímeros de menor peso molecular. Neste estudo, blendas de HPMC e Carbopol<sup>®</sup> resultaram em uma maior força adesiva e duração da liberação da prednisolona.



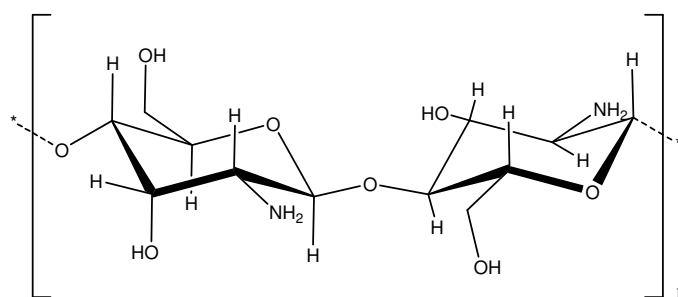
**Figura 2:** Estrutura química do HPMC

### 2.3.2 Quitosana

A quitosana, cuja estrutura está representada na figura 3, é um polissacarídeo catiônico semi-sintético obtido por desacetilação da quitina, que possui características mucoadesivas devido à atração eletrostática com as cargas negativas da superfície da mucosa (DHAWAN; SINGLA; SINHA, 2004; SALAMAT-MILLER, 2005). Este polímero apresenta características bioadesivas, biodegradáveis

e biocompatíveis (CAFAGGI et al., 2005), além de propriedades de regeneração de tecido e atividade antimicrobiana (IKINCI et al., 2006).

Comparando-se com os demais polímeros, a quitosana possui a vantagem de promover a permeação na mucosa, atuando diretamente sobre as junções íntimas do epitélio, provocando sua abertura transitória e, como consequência, o aumento da permeabilidade e do transporte paracelular, inclusive de moléculas de tamanho elevado, como peptídeos e proteínas (ARTURRSON et al., 1994; ILLUM, 1998; MAKHOLOF; WERLE; TAKEUCHI, 2008).

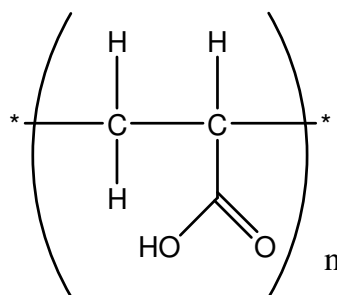


**Figura 3:** Estrutura química da Quitosana

Ikinci e colaboradores (2006) observaram um aumento na liberação da nicotina após a administração bucal de comprimidos mucoadesivos proporcional ao aumento da concentração de quitosana na formulação. No entanto, uma maior concentração do polissacarídeo resultou em uma diminuição da capacidade bioadesiva do comprimido.

### 2.3.3 Carbopol<sup>®</sup>

O Carbopol<sup>®</sup>, com a estrutura química representada na figura 4, é um polímero aniônico derivado do ácido poliacrílico com alto peso molecular (KIBBE, 2000), que possui características bioadesivas, exibindo boa retenção *in vitro* e *in vivo* (KOCKISCK et al., 2001). Este polímero apresenta baixa toxicidade e biocompatibilidade, sendo interessante na formulação de produtos destinados a uso frequente (KEEGAN et al., 2007).



**Figura 4:** Estrutura química do Carbopol®

Perioli e colaboradores (2004) desenvolveram um comprimido mucoadesivo a partir de uma blenda de Carbopol® com hidroxietilcelulose (HEC). Este comprimido apresentou um desempenho bastante satisfatório, com uma permanência no local de aplicação de 12 h em estudo *in vivo* realizado em voluntários humanos. Segundo os autores, a utilização da blenda justifica-se pelas melhores propriedades bioadesivas do Carbopol® associado à baixa toxicidade do derivado celulósico.

#### 2.4 Comprimidos mucoadesivos

Os comprimidos representam, em termos mercadológicos, a forma farmacêutica mais consumida e constituem a forma farmacêutica sólida mais adequada para produção em escala industrial, possibilitando um menor custo efetivo. Comprimidos que contêm polímeros mucoadesivos devem apresentar tamanho reduzido, o que permite a funcionalidade no lugar de aplicação, mantendo-se no local durante o tempo necessário. O efeito farmacológico pode ocorrer no local da administração ou de forma sistêmica, por meio da absorção através da mucosa (DUCHÊNE; PONCHEL, 1997; LACHMAN; LIBERMAN; KANING, 2001; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Nos últimos anos, diversos tipos de comprimidos destinados à aplicação em diferentes mucosas vêm sendo desenvolvidos (KARASULU et al., 2004; PERIOLI et al., 2004; WEYENBERG et al., 2006). Especificamente os comprimidos para aplicação na mucosa oral, permitem ao usuário beber e conversar sem maior desconforto. Os comprimidos são suaves, se aderem à mucosa e são retidos na mesma posição até completa dissolução e/ou liberação do fármaco. Podem ser aplicados em diferentes locais da cavidade oral, incluindo o palato, a mucosa da

bochecha, lábios e gengiva. Sucessivas aplicações desses comprimidos podem ser feitas em locais alternados da boca (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005).

## **2.5 Compressão**

A compressão é um método de fabricação de comprimidos que pode ser realizado através de três tipos de procedimentos: a compressão direta, a granulação por via úmida e a granulação por via seca (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; LACHMAN; LIBERMAN; KANING, 2001).

### **2.5.1 Compressão Direta**

O método mais utilizado para preparação de comprimidos mucoadesivos é a compressão direta (CHIAPPETTA et al., 2006; IKINCI et al., 2006; MOHAMMADI-SAMANI; BAHRI-NAJAFI; YOUSEFI, 2005; PERIOLI et al., 2004;), considerada a técnica de escolha para a fabricação de comprimidos que contém fármacos termolábeis e sensíveis à umidade (JIVRAJ; MARTINI; THOMSON, 2000). Por comprimir diretamente o pó ou a mistura de pós, esta técnica minimiza o número de operações, reduzindo custos e tempo (ALDERBORN, 2005). No entanto, para que esta técnica de compressão possa ser utilizada, é necessário que o pó ou mistura de pós apresente fluxo livre e propriedades coesivas adequadas (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

No caso de pós desprovidos dessas propriedades, a adição de excipientes farmacêuticos pode dotar a mistura de pós de características mais adequadas. Quando a presença de excipientes não é suficiente, a granulação pode ser utilizada para conferir as qualidades necessárias para a fabricação de comprimidos (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

## 2.5.2 Granulação

A granulação tem por objetivo principal a melhoria das propriedades de fluxo e das características de compressibilidade de uma mistura de pós, assim como a prevenção da segregação dos constituintes, manejo da densidade e da distribuição granulométrica, da forma e das estruturas internas e superficiais (SUMMERS; AULTON, 2005).

Os granulados são obtidos por meio do emprego de aglutinantes, adjuvantes primários tecnológicos que tem como objetivo manter a coesão entre as partículas primárias. A granulação pode ser classificada quanto ao agente de formação de grânulos, seja pela presença de um líquido ou pelo exercício de pressão no qual ocorre a compactação, respectivamente por via úmida e por via seca. Podem, também, ser diferenciados quanto ao princípio de aglomeração, como granulados formados através da agregação direta ou por desagregação após obtenção de conglomerados maiores (COUTO; ORTEGA; PETROVICK, 2000; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

No entanto, comparada à compressão direta, a granulação requer inúmeras operações unitárias adicionais, as quais representam a agregação de maior custo em termos de tempo, equipamentos, espaço físico, recursos humanos e procedimentos. Além disso, dela decorre a necessidade de etapas adicionais de validação e otimização de processo (AUGSBURGER; VUPPALA, 1997).

### 2.5.2.1 Granulação por via seca

A granulação por via seca é especialmente aplicável a materiais que não podem ser preparados por via úmida, devido ao fato de apresentarem instabilidade frente à umidade ou à temperatura durante o processo de secagem do granulado ou que se apresentem muito solúveis em água (SOARES; PETROVICK, 1999).

No processo de granulação por via seca, a pressão é responsável pela coesão das partículas primárias. A mistura do componente ativo e dos adjuvantes é submetida a uma compactação prévia, originando grandes aglomerados,

denominados compactos ou briquetes, que devem possuir elevada resistência mecânica, distribuída homoganeamente, a fim de evitar quantidade excessiva de partículas finas durante a próxima operação, que consiste na granulação. Na granulação ocorre o desmonte da massa compactada e conseqüente formação dos grânulos. O processo é finalizado com a etapa de calibração, que consiste na seleção de grânulos com dimensões uniformes, dentro de uma faixa granulométrica determinada (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007; COUTO; ORTEGA; PETROVICK, 2000).

#### 2.5.2.2 Granulação por via úmida

O emprego de umidade e calor na granulação por via úmida exige que o produto se apresente suficientemente insolúvel no líquido utilizado para umedecimento e se mantenha quimicamente estável durante o tempo de exposição ao calor nas faixas de temperatura adequadas para a secagem dos grânulos obtidos por desagregação (COUTO; ORTEGA; PETROVICK, 2000).

Na granulação por via úmida convencional, o líquido de umectação é adicionado à mistura pulveréa em misturadores, com a finalidade exclusiva de umedecer a mistura de pós, podendo eventualmente promover a dissolução apenas parcial de um ou mais constituintes da mistura pós. A massa umedecida é forçada através de um tamis para que produza os grânulos no tamanho desejado. As partículas assim formadas são secas pela ação do calor e do ar (COUTO; ORTEGA; PETROVICK, 2000; ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

## 2.6 Herpes Simples (HSV)

Inúmeras pesquisas direcionam-se ao tratamento de infecções pelos vírus herpéticos tipos 1 (HSV-1) e 2 (HSV-2), pelo fato de estes apresentarem uma participação expressiva nas doenças infecto-contagiosas no mundo e, muitas vezes, serem situações com graves conseqüências, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (HERGET et al., 2005).

Os vírus herpéticos estão associados a infecções localizadas no epitélio da mucosa das genitais, cavidade oral, faringe, esôfago e olhos, dependendo do tipo do vírus envolvido. São altamente contagiosos, sendo a principal forma de disseminação o contato direto com secreções infectadas (DREW, 2004).

Após a inoculação na pele ou nas mucosas, os vírus replicam-se nas células epiteliais. O período de incubação é de quatro a seis dias, causando destruição celular e inflamação local, resultando em lesões vesiculosas sobre uma base eritematosa, muito dolorosa, mas de regressão espontânea (CECIL; GOLDMAN; AUSIELLO, 2005; DE FARIA, 1999).

É observada nestes vírus a capacidade de estabelecer infecção latente e crônica por toda a vida do hospedeiro, variando o sítio de latência de acordo com a subfamília. O HSV-1 pertence à sub-família  *$\alpha$ -Herpesviridae* estabelecendo latência nos nervos sensoriais, podendo ser reativado em infecções recorrentes sintomáticas ou assintomáticas (BRADY; BERNSTEIN, 2004). O processo de saída do estado latente é desencadeado por fatores relacionados à redução da resposta imune do indivíduo, quadro normalmente associado a deficiências alimentares, fadiga e estresse, mas também existente em portadores de imunossupressão congênita, adquirida ou medicamentosa (McCORMACK et al., 1996).

As principais manifestações clínicas do HSV-1 caracterizam-se por gengivomastites, faringotonsilites, querato-conjuntivites, encefalites, infecções neonatais e Herpes labial (BRADY; BERNSTEIN, 2004).

### **2.6.1 Herpes Labial**

O herpes labial se caracteriza por uma condição bastante incômoda, com formação de vesículas acompanhadas de coceira e ardência no local, nas quais há extravasamento de líquido celular. Após o término desta fase, estas vesículas secam, restando no local um tecido lesado, altamente queratinizado, diferindo das características normais do tecido da mucosa oral. Todo o processo pode levar de 2 a 12 dias (McCORMACK et al., 1996).



Atualmente, as infecções causadas pelo HSV estão entre as mais comuns na população e é estimado que 60-95% das pessoas adultas estejam infectadas. Estudos soroepidemiológicos indicam que a prevalência de anticorpos para HSV variam diretamente conforme a idade e o nível socioeconômico da população estudada. Nos países em desenvolvimento, 90% da população apresentam, aos 30 anos de idade, anticorpos anti-HSV-1 (DREW, 2004).

Para a seleção do tratamento, alguns fatores importantes devem ser considerados, tais como a imunidade do paciente, o local da infecção e se a infecção é primária ou recorrente. Entre os agentes anti-herpéticos disponíveis estão o aciclovir, valaciclovir, penciclovir, fanciclovir, trifluoridina, vidarabina, foscarnet, cidofovir, docosanol, brivudina e o ganciclovir (BRADY; BERNSTEIN, 2004), sendo o tratamento de primeira escolha o uso tópico de formulações contendo aciclovir.

O aciclovir possui baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral devido à reduzida solubilidade da molécula, à ineficiência da partição lipídica e ao trânsito gastrointestinal rápido, sendo absorvida apenas 15-30% da dose administrada. Além disso, possui um reduzido tempo de meia-vida, de apenas 1-3 horas, e sua concentração na saliva é bastante reduzida (DEGIM; EGLIN; OCAK, 2006). Na tentativa de solucionar estes problemas e sabendo da necessidade do desenvolvimento de um tratamento tópico mais eficaz contra o Herpes labial, a empresa francesa BioAlliance Pharma pretende lançar no mercado até 2010 o aciclovir Lauriad®, um comprimido bioadesivo bucal com efeito local e sistêmico e que libera altas concentrações do antiviral no local da infecção (BIOALLIANCE PHARMA, 2009). Esta formulação é baseada na constatação de que a proximidade física do comprimido permite a penetração do fármaco diretamente na mucosa bucal e, conseqüentemente, uma concentração local mais elevada será atingida rapidamente, além da diminuição da dose administrada e minimização de possíveis efeitos indesejáveis.

Por outro lado, como alternativa para o tratamento de infecções virais, surge a busca por substâncias de origem natural, principalmente extratos e compostos isolados de fungos. Nos últimos anos, diversos trabalhos foram publicados sobre a

atividade antiviral de produtos naturais. A maioria destes descreve pesquisas realizadas com extratos ou compostos isolados de plantas selecionadas por serem amplamente utilizados na medicina popular (RUFFA et al., 2004).

Neste contexto, o Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) da Universidade Federal de Santa Catarina vem testando produtos naturais e sintéticos a fim de detectar atividade antiviral. Extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides*, desenvolvidos pelo grupo de Bassani (2001) (INPI PI 0103468-5) foram estudados no LVA por Bettega e colaboradores (2004). Neste estudo, foi avaliada a atividade antiviral *in vitro* de três extratos secos nebulizados (ESN) contendo 50 % de extrato hidroetanólico rico em flavonóides, sendo os restantes 50% blendas de diferentes adjuvantes. A atividade antiviral foi avaliada utilizando herpes Simplex vírus tipo 1 (HSV-1), cepa 29-R (resistente ao aciclovir) e cepa KOS (sensível ao aciclovir). O conjunto dos resultados obtidos indica que os extratos estudados podem ser considerados promissores para o tratamento de infecções herpéticas causadas pelo HSV-1, caracterizadas por sua localização majoritária em lábios e mucosas, com destaque para a formulação denominada N2, constituída de uma solução extrativa hidroalcoólica (80%, p/v) de *Achyrocline satureioides* contendo os seguintes adjuvantes: polissorbato 80 (10%, p/p), dióxido de silício coloidal (20%, p/p) e celulose microcristalina (20%, p/p).

Com base no exposto, a incorporação de um extrato seco nebulizado de marcela em um comprimido oral com o intuito de obter um sistema mucoadesivo de administração bucal para o tratamento de infecções herpéticas torna-se uma alternativa muito promissora. Desta forma, a hipótese na qual se baseia este trabalho é que comprimidos mucoadesivos permitiriam uma longa permanência deste ESN no local de ação, além de uma lenta dissolução e uma liberação constante dos flavonóides na cavidade bucal.

### **3 OBJETIVOS**

---

### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar comprimidos mucoadesivos elaborados à base de um extrato seco nebulizado padronizado de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Asteraceae.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o extrato seco nebulizado de *A. satureioides* quanto aos teores de umidade e de quercetina (marcador químico);
- Caracterizar os excipientes de compressão selecionados;
- Estudar as características tecnológicas de formulações obtidas a partir de misturas de extrato seco nebulizado de *A. satureioides* com diferentes polímeros ou suas blendas;
- Preparar comprimidos por granulação por via seca com base em um delineamento experimental;
- Avaliar e comparar as propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos comprimidos elaborados;
- Desenvolver e validar o método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência para determinar o teor de quercetina nos comprimidos;
- Avaliar as características de intumescimento e erosão *in vitro* dos comprimidos;
- Preparar e caracterizar uma formulação otimizada a partir dos resultados obtidos com as formulações do delineamento experimental;
- Avaliar o tempo de mucoadesão da formulação otimizada e demais formulações;
- Desenvolver e validar o método para avaliar o perfil de liberação *in vitro* da quercetina a partir da formulação otimizada e demais comprimidos desenvolvidos;
- Estudar o perfil, bem como a cinética de liberação *in vitro* da quercetina a partir dos comprimidos.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

---

## 4.1 MATERIAIS

### 4.1.1 Extrato vegetal

O extrato seco de marcela utilizado neste trabalho foi gentilmente cedido pela Professora Dra. Valquiria Linck Bassani, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Esse produto seco por aspersão (*spray-drying*), juntamente com o processo de preparo, tornou-se objeto de patente (INPI PI 0103468-5, BASSANI et al., 2001). O ESN foi elaborado a partir de uma solução extrativa hidroalcoólica (80%, p/v) de *Achyrocline satureioides* contendo os seguintes adjuvantes: polissorbato 80 (10%, p/p), dióxido de silício coloidal (20%, p/p) e celulose microcristalina (20%, p/p).

### 4.1.2 Matérias-primas

- Carbopol<sup>®</sup> 940 (Embacaps – Brasil);
- Celulose microcristalina (Biotec - Brasil);
- Dióxido de silício coloidal (Galena, Brasil);
- Estearato de magnésio (Quimidrol - Brasil);
- Hidroxipropilmetilcelulose K100 LV (Blanver – Brasil);
- Quercetina (Sigma Alderich - EUA);
- Quitosana (Galena, Brasil);

### 4.1.3 Solventes e reagentes

Todos os solventes citados apresentam qualidade pró-análise (p.a.), exceto quando especificado diferentemente. Toda a água empregada no trabalho foi purificada por destilação ou osmose reversa.

- Acetato de etila (F. Maia - Brasil);
- Ácido fosfórico 85% (CPQ – Brasil);
- Cloreto de sódio (Vetec - Brasil);
- Adesivo instantâneo de éster de cianoacrilato (Henkel, Brasil);

- Fosfato de potássio monobásico (Vetec - Brasil);
- Fosfato de sódio dibásico (Vetec - Brasil);
- Metanol grau CLAE (J. Backer - Brasil);
- Polissorbato 20 (Vetec – Brasil);
- Polissorbato 80 (Synth – Brasil).

#### 4.1.4 Equipamentos e utensílios

- Agitador de Tamises para análises granulométricas (Série 9904),
- Agitador magnético Are-Velp Scientifica;
- Aparelho para determinação do ângulo de repouso (adaptado por Guterres, 1990);
- Balança analítica Ohaus Corporation AS200;
- Banho de ultrassom Ultrasonic Cleaner Unique USC - 700;
- Centrífuga Sigma 4K 15;
- Coluna RP-C<sub>18</sub> Agilent Zorbax ODS (150 mm x 4.6 mm, 5 µm);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer S200, com bomba binária S 200, Detector UV/Vis, injetor automático S 200,
- Dessecador;
- Destilador;
- Dissolutor Nova Ética (Modelo 299);
- Dissolutor Varian (Modelo VK7000E , EUA)
- Durômetro Nova Ética (Modelo 300);
- Espectrofotômetro na região do infravermelho Perkin Elmer (Modelo 21);
- Estufa Nova Ética (Modelo 402/3N);
- Evaporador rotatório Quimis (Modelo Q-344B2);
- Filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm (Millipore);
- Friabilômetro Nova Ética (Modelo 298-AT);
- Granulador (Fabbe);
- Máquina de compressão Excêntrica (Fabbe);
- Paquímetro (Digimess);
- Pesa-filtro;

- pHmetro Oakton Acorns series;
- Sistema de purificação Milli-Q<sup>®</sup> (Millipore);
- Volúmetro de compactação;

#### **4.1.5 Material biológico**

- Esôfago de porco

Para a realização do estudo do tempo de mucoadesão foram utilizados esôfagos congelados isolados de porcos obtidos no Frigorífico Antônio Carlos, situado em Antônio Carlos, Santa Catarina – Brasil.

## **4.2 MÉTODOS**

### **4.2.1 Caracterização das matérias-primas**

#### **4.2.1.1 Caracterização do Extrato Seco Nebulizado (ESN)**

##### **4.2.1.1.1 Teor de umidade**

Exatamente cerca de um grama de ESN foi pesado e transferido para pesa-filtro previamente dessecado durante 30 minutos. O pesa-filtro foi colocado em estufa a 105 °C durante duas horas e, a seguir, transferido para dessecador por 20 minutos. Após o resfriamento, o pesa-filtro foi pesado e colocado na estufa a 105 °C por mais 1 hora. A operação foi repetida até a obtenção de peso constante (quando a diferença entre duas pesagens consecutivas não excede a 5 mg). O resultado de perda por dessecação do ESN foi expresso em porcentagem ponderal, através da média de três determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).



#### 4.2.1.1.2 Quantificação do teor de Marcador Químico no ESN por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – Quercetina

Para o doseamento do ESN e formulações derivadas, a metodologia foi desenvolvida e validada, e os parâmetros avaliados encontram-se descritos no item 4.2.5, página 49. A metodologia de extração da quercetina a partir da amostra de ESN, descrita a seguir, foi adaptada do procedimento descrito por De Souza (2007).

Duzentos microgramas de ESN foram exatamente pesados, transferidos para erlenmeyer com tampa esmerilhada e posteriormente, extraídos com 20 mL de acetato de etila por duas horas, sob agitação magnética. A solução obtida foi filtrada sob vácuo e reservada. A extração foi repetida com o resíduo e o filtro. Em seguida, as duas porções foram reunidas em um balão de fundo redondo e o acetato de etila eliminado em rotaevaporador. Por fim, o resíduo obtido foi retomado com 20 mL de metanol.

Para análise cromatográfica, 1,0 mL dessa solução foi diluída a 10 mL com metanol:solução de ácido fosfórico 1% (55:45, v/v). Esta solução foi filtrada em filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore), colocada em *vial* de uso exclusivo do cromatógrafo líquido, prosseguindo com a análise quantitativa por CLAE.

#### 4.2.1.2 Caracterização dos excipientes

Os excipientes utilizados na preparação dos comprimidos, bem como sua respectiva função na formulação, estão descritos na quadro 1.

**Quadro 1:** Excipientes empregados na produção dos comprimidos mucoadesivos bucais de *Achyrocline satureioides* e suas funções.

<b>Excipientes</b>	<b>Função</b>
Quitosana	Mucoadesivo
Carbopol®	Mucoadesivo e formador de matriz de liberação modificada
Hidroxipropilmetilcelulose	Mucoadesivo e formador de matriz de liberação modificada
Estearato de Magnésio	Lubrificante

#### 4.2.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho (IV)

Cada excipiente (estearato de magnésio, Carbopol®, quitosana e HPMC) foi preparado através da mistura com uma quantidade determinada de brometo de potássio. Os espectros obtidos foram comparados com os espectros disponíveis na literatura.

Para a interpretação dos espectros no infravermelho, foi utilizada a fórmula molecular de cada excipiente bem como dados obtidos por Barbosa (2007).

#### 4.2.1.2.2 Teor de umidade

A avaliação do teor de umidade dos excipientes foi realizada conforme metodologia descrita no item 4.2.1.1.1, página 40.

### **4.2.2 Estudo de formulação 1: avaliação das características tecnológicas das misturas de excipientes**

#### 4.2.2.1 Delineamento experimental

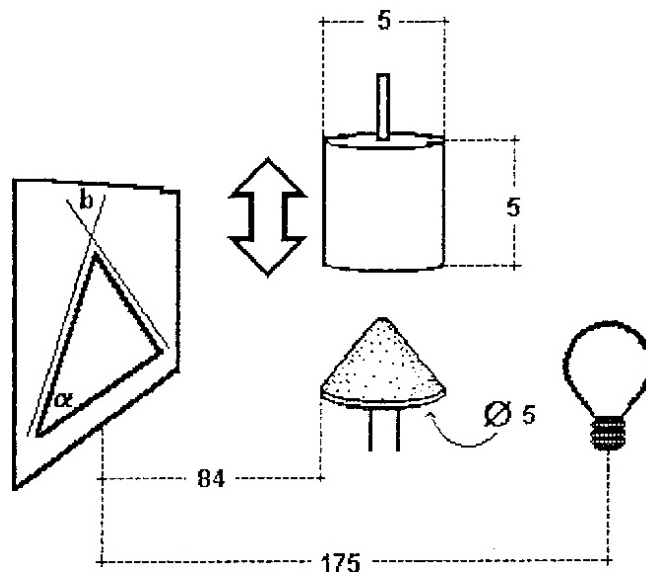
A quantidade de ESN foi determinada diante de testes preliminares com diferentes blendas dos polímeros.

Após isso, foi elaborada uma matriz de planejamento, utilizando três tipos de polímeros em diferentes proporções tendo como objetivo, avaliar a influência das características iônicas dos polímeros (não-iônico, catiônico e aniônico) sobre as formulações.

#### 4.2.2.2 Caracterização tecnológica das formulações: fluxo e compressibilidade

##### 4.2.2.2.1 Determinação do Ângulo de Repouso

Para a determinação do ângulo de repouso foi utilizado um aparelho adaptado por Guterres (1990) (Figura 5). Este equipamento é constituído de um cilindro móvel ajustado a uma base fixa, acoplado a um motor que, quando acionado, separa o cilindro da base pela ascensão do mesmo. Papel milimetrado foi utilizado para o registro da sombra projetada pela incidência de uma fonte luminosa, sobre o cone do pó formado após a elevação do cilindro contendo a amostra. Para cada formulação foram realizadas cinco determinações utilizando-se cerca de 15 gramas de amostra. As medidas foram feitas diretamente através do registro das sombras projetadas, utilizando-se transferidor e o ângulo calculado segundo a equação (1):



**Figura 5:** Aparelho para determinação do ângulo de repouso (dimensões em centímetros)

Equação 1

$$\text{Ângulo} = \frac{180 - b}{2}$$

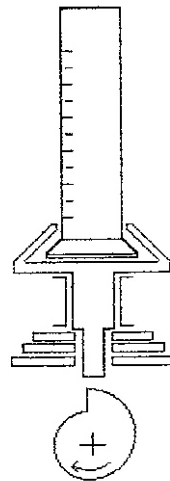
Em que:

Ângulo = Ângulo de repouso

b= ângulo do ápice do triângulo

#### 4.2.2.2.2 Determinação das densidades bruta e de compactação

Cinco gramas das formulações foram pesados, separadamente, e transferidos cuidadosamente para proveta de 50 mL para medida do volume ocupado pelo pó e determinação de sua densidade bruta. A densidade de compactação foi determinada com auxílio de volúmetro de compactação (figura 6). O pó contido na proveta do aparelho foi submetido a 10, 500 e 1250 quedas. O ensaio foi repetido até que a diferença entre duas leituras subsequentes fosse inferior a 1 mL (GUYOT et al., 1995).



**Figura 6:** Volúmetro de compactação

#### 4.2.2.2.3 Fator de Hausner (FH)

O fator de Hausner (WELLS, 1988) foi determinado através do quociente entre as densidades de compactação e bruta do pó, conforme a equação (2).

Equação 2

$$FH = \frac{dc}{db}$$

Em que:

FH= fator de Hausner

dc= densidade de compactação (g/mL)

db = densidade bruta (g/mL)

#### 4.2.2.2.4 Índice de compressibilidade (IC)

O índice de compressibilidade ou índice de Carr (CARR, 1965) corresponde à média dos índices de compressibilidade calculados a partir dos valores individuais de densidades de compactação e bruta (equação 3).

Equação 3

$$IC = \frac{dc - db}{dc} \times 100$$

Em que:

IC= índice de compressibilidade (%)

dc= densidade de compactação (g/mL)

db= densidade bruta (g/mL)

#### 4.2.2.2.5 Compactabilidade das misturas

A compactabilidade (C) foi determinada pela diferença entre os volumes após 10 ( $V_{10}$ ) e 500 ( $V_{500}$ ) quedas em volúmetro de compactação. O resultado corresponde à média de três valores de (C) calculados a partir dos valores individuais de três determinações, conforme a equação (4).

Equação 4

$$C = V_{10} - V_{500}$$

Em que:

C= Compactabilidade das misturas

$V_{10}$ = Volume após 10 quedas

$V_{500}$ = Volume após 500 quedas

Com base nos resultados obtidos neste primeiro estudo de formulação, um novo estudo foi delineado, incorporando-se a granulação via seca no processo de obtenção dos comprimidos.

#### **4.2.3 Estudo de formulação 2: preparação de comprimidos a partir de granulados**

##### 4.2.3.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi obtido com auxílio de um *software* Design-Expert<sup>®</sup> utilizando uma metodologia de planejamento com mistura *D-optimal*. O objetivo desse estudo foi estabelecer qual a melhor proporção dos polímeros que proporciona uma menor erosão e intumescimento do sistema matricial. A composição pormenorizada das formulações inicialmente desenvolvidas encontra-se na seção 5.3 (Resultados e Discussão, página 70).

##### 4.2.3.1.1 Granulação Via Seca

A técnica de preparação foi escolhida de acordo com a avaliação das características tecnológicas das formulações (item 4.2.2.2, página 42).

A técnica de granulação via seca constitui-se das seguintes etapas:

1. Mistura dos pós por diluição geométrica, em gral de vidro, seguida de homogeneização por 5 minutos;
2. Compactação da mistura dos pós com auxílio da máquina de compressão excêntrica Fabbe formando os briquetes;
3. Granulação dos briquetes em granulador oscilante com abertura de malha de 2,00 mm;
4. Calibração dos granulados através de tamisação empregando-se um agitador de tamises por 10 min. A faixa granulométrica entre 250 – 1000  $\mu\text{m}$  foi escolhida para a produção dos comprimidos;

5. Adição de aglutinante (Carbopol<sup>®</sup>, 10%, p/p) ao granulado, seguido de homogeneização da mistura em gral;
6. Compressão. A câmara de compressão foi ajustada para conter cerca de 200 mg da mistura. Foi utilizada punção dupla circular plana de 10 mm de diâmetro.

Durante o processo foram avaliados o peso e a dureza. A força de compressão foi ajustada para obter comprimidos com dureza de cerca de 10 Kgf. Durante todas as etapas da operação de compressão por granulação via seca, as condições de temperatura e umidade foram controladas ( $25 \pm 1$  °C;  $45 \pm 5$  UR).

#### **4.2.4 Caracterização dos comprimidos**

A caracterização de comprimidos das diferentes formulações foi realizada por meio dos ensaios descritos na Farmacopéia Brasileira (1988) para formas farmacêuticas sólidas.

##### **4.2.4.1 Avaliação da aparência e dimensões**

Os comprimidos foram avaliados visualmente levando em consideração a homogeneidade de coloração, forma, rugosidade de superfície e defeitos físicos do processo de compressão. A espessura e diâmetro foram determinados com auxílio de um paquímetro.

##### **4.2.4.2 Peso médio**

Vinte comprimidos de cada formulação, escolhidos aleatoriamente, foram pesados individualmente. Calculou-se o peso médio, permitindo-se uma variação de  $\pm 7,5\%$  (Farmacopéia Brasileira, 1988).

#### 4.2.4.3 Dureza

Foram submetidas dez unidades ao teste, objetivando verificar a resistência dos mesmos a uma força aplicada diametralmente através do Durômetro. A dureza mínima aceitável é 3 Kgf (Farmacopéia Brasileira, 1988).

#### 4.2.4.4 Friabilidade

Vinte comprimidos foram pesados e submetidos à ação do friabilômetro a uma velocidade de vinte e cinco rotações por minuto durante quatro minutos. Decorrido o prazo, removeu-se qualquer resíduo de pó da superfície dos comprimidos e estes foram novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o peso final dos comprimidos representa a friabilidade em função da porcentagem de pó perdido. Consideram-se aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso (Farmacopéia Brasileira, 1988).

#### 4.2.4.5 Teor de marcador químico nos comprimidos

Considerando a inexistência de método analítico para a quantificação de quercetina em comprimidos, uma metodologia analítica utilizando CLAE foi desenvolvida e validada.

##### 4.2.4.5.1 Preparação das amostras de comprimidos para análise

Cinco comprimidos foram finamente pulverizados. Uma quantidade do pó correspondente a dois comprimidos (400 mg) foi exatamente pesada, transferida para erlenmeyer com tampa esmerilhada, posteriormente extraída com 20 mL de acetato de etila por duas horas sob agitação magnética. A solução obtida foi filtrada sob vácuo e reservada. A extração foi repetida com o resíduo e o filtro. Em seguida, as duas porções foram reunidas em um balão de fundo redondo e o acetato de etila eliminado em rotaevaporador. Por fim, o resíduo obtido foi retomado com 20 mL de metanol.



Para análise cromatográfica, 1,0 mL dessa solução foi diluída a 10 mL com metanol: solução de ácido fosfórico 1% (55:45, v/v). Esta solução foi filtrada em filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore), colocada em *vial* de uso exclusivo do cromatógrafo líquido, prosseguindo com a análise quantitativa por CLAE.

#### **4.2.5 Validação do método de doseamento do marcador químico nos comprimidos**

A validação da metodologia analítica foi realizada conforme critérios estabelecidos pelo ICH (2005) e pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), publicada como resolução (BRASIL, 2003) através dos parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e robustez.

##### **4.2.5.1 Condições Cromatográficas**

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Perkin Elmer S 200 composto por uma bomba binária, um controlador automático de fluxo, um injetor automático (com alça dosadora de até 200  $\mu\text{l}$ ), um detector espectrofotométrico UV/VIS e um desgaseificador. Foi utilizada uma pré-coluna Phenomenex ODS (4,0 x 3,0mm) acoplada a uma coluna Zorbax ODS (5  $\mu\text{m}$  – 150 mm x 4,6 mm i.d.). A fase móvel foi constituída de uma mistura de metanol:solução de ácido fosfórico 1% (55:45, v/v). Essa solução foi desgaseificada e filtrada. As condições de operação foram em modo isocrático, com fluxo de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , detecção de 369 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ , a temperatura ambiente.

A concentração do marcador químico nas amostras foi estimada por CLAE utilizando o programa TOTALCHROM, através da medida da área dos picos detectados.

#### 4.2.5.2 Curva Padrão

Uma curva padrão foi construída utilizando as condições cromatográficas descritas acima, contemplando concentrações de 10 a 30  $\mu\text{g/mL}$ . A partir de uma solução mãe de quercetina 1000  $\mu\text{g/mL}$  foram preparadas diluições 10, 15, 20, 25 e 30  $\mu\text{g/mL}$  utilizando a fase móvel como diluente.

A equação da reta foi estabelecida através do estudo de regressão linear. A linearidade foi avaliada através da construção de três curvas de calibração, em diferentes dias.

#### 4.2.5.3 Precisão

A repetibilidade do método cromatográfico foi avaliada utilizando uma mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos, a qual foi contaminada com 20  $\mu\text{g/mL}$  de quercetina. A amostra foi preparada como descrito no item 4.2.4.5.1, página 48, e injetada seis vezes em um mesmo dia. A precisão intermediária, por sua vez, foi determinada pela análise de seis réplicas na mesma concentração realizadas em três dias distintos. A precisão foi expressa através dos desvios padrões relativos obtidos.

#### 4.2.5.4 Especificidade

Uma mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos, após passarem pela preparação da amostra (descrita no item 4.2.4.5.1, página 48), foram injetados no cromatógrafo a fim de garantir que os componentes do comprimido não interferem na detecção e quantificação do marcador químico – quercetina.

#### 4.2.5.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada através de um teste de recuperação. Uma mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos foi contaminada com concentrações conhecidas de quercetina nas proporções de 80, 100 e 120% da concentração teste (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e submetidas a preparação da amostra conforme

item 4.2.4.5.1, página 48. Amostras dos comprimidos placebo, dos comprimidos contaminados e das soluções de quercetina 80, 100 e 120% foram injetadas em triplicata. As porcentagens de recuperação foram calculadas conforme a equação:

Equação 5

$$R\% = \frac{C_{cc} - P_{cc}}{S_Q}$$

Em que:

R % = porcentagem de recuperação

C<sub>CC</sub> = comprimidos contaminados

P<sub>CC</sub> = comprimidos placebos

S<sub>Q</sub> = soluções de quercetina

#### 4.2.5.6 Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)

O LQ e LD foram calculados através das fórmulas matemáticas preconizadas pelo ICH (2005), sendo utilizados os valores de desvio padrão e de inclinação das curvas de calibração construídas no item linearidade. O LQ e LD podem ser expressos pelas equações 6 e 7:

Equação 6

$$LD = \frac{DP \times 3,3}{IC}$$

Equação 7

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC}$$

Em que:

LQ = limite de quantificação

LD= limite de detecção

DP = desvio padrão do intercepto com o eixo de Y

IC = inclinação da curva de calibração

## 4.2.6 Características de intumescimento e erosão dos comprimidos

### 4.2.6.1 Avaliação do intumescimento dos comprimidos

O intumescimento dos comprimidos foi avaliado por gravimetria conforme metodologia adaptada de Tirosh e colaboradores (1997). O meio de intumescimento selecionado foi saliva artificial (CHIAPPETTA et al., 2006; PERIOLI et al., 2004). Para cada litro de saliva artificial preparada foram pesados 2,38 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,19 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 8,00 g NaCl e o volume final completado com água destilada. Uma solução de ácido fosfórico a 50% foi preparada para ajustar o pH a 6,0.

Cada comprimido foi individualmente pesado em balança analítica (P1) e imerso em saliva artificial por tempos determinados (0,5, 1, 2, 4, 8, 24h). Após a imersão, o comprimido foi seco com papel filtro e novamente pesado (P2). A capacidade de hidratação dos comprimidos foi avaliada utilizando a seguinte equação (8):

Equação 8

$$H = \frac{P2 - P1}{P2 \times 100}$$

Em que:

H = Capacidade de hidratação

P1 = Peso inicial

P2 = Peso do comprimido intumescido

### 4.2.6.2 Avaliação da erosão dos comprimidos

A erosão dos comprimidos foi avaliada por gravimetria conforme metodologia adaptada de Tirosh e colaboradores (1997). Após a determinação de P2, o comprimido intumescido foi seco em estufa a 60 °C por 24 horas, sendo posteriormente transferido para dessecador por 48 horas. Transcorrido este tempo, o comprimido foi novamente pesado (P3). A erosão da matriz (EM) foi avaliada utilizando a seguinte equação (9):

Equação 9

$$EM = \frac{P1 - P3}{P1 \times 100}$$

Em que:

EM = Erosão da matriz

P1 = Peso inicial do comprimido

P3 = Peso do comprimido após a erosão

#### 4.2.7 Tempo de mucoadesão *in vitro*

A metodologia para avaliação do tempo de adesão *in vitro* do comprimido à mucosa foi adaptada a partir do procedimento descrito por Perioli e colaboradores (2004).

Um segmento de esôfago de porco foi fixado no lado interno da cuba do aparelho de dissolução Nova Ética com cola de éster de cianoacrilato. Em seguida, um lado do comprimido foi umedecido com 50 µL de saliva artificial (pH= 6,75) e pressionado contra a superfície da mucosa por 20 segundos. A cuba foi preenchida com 800 mL de saliva artificial (pH 6,75). Por fim, após 2 minutos, o meio foi agitado em uma velocidade de 150 rpm com temperatura controlada (37°C ± 0,5), simulando a cavidade bucal. O estudo do tempo de mucoadesão teve uma duração total de 24 horas.

#### 4.2.8 Determinação do perfil de liberação *in vitro*

Para garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de dissolução *in vitro*, alguns parâmetros de validação foram analisados conforme descritos abaixo.

##### 4.2.8.1 Validação do método de dissolução dos comprimidos

###### 4.2.8.1.1 Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas conforme condições descritas no item 4.2.5.1, página 49.

#### 4.2.8.1.2 Avaliação da influência do filtro

Para esta análise utilizou-se o meio de dissolução, previamente filtrado com posterior acréscimo de 10 µg/mL de quercetina. Esta solução foi injetada no CLAE seguida da injeção desta mesma solução filtrada em filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm (Millipore).

#### 4.2.8.1.3 Determinação da solubilidade de quercetina em diferentes meios de dissolução

Para a escolha do meio de dissolução, a solubilidade de quercetina foi estimada em água, saliva artificial e saliva artificial com polissorbato 20 em diferentes concentrações (0,25, 0,3, 0,45 e 0,5%) (p/v). Dez mililitros de cada meio a ser testado e um excesso de quercetina foram adicionados em um frasco âmbar, obtendo-se uma suspensão. Os frascos foram providos de agitação magnética, permanecendo por 24 horas sob agitação. O conteúdo dos frascos foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi filtrado imediatamente em filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45 µm (Millipore). Os filtrados foram injetados diretamente no cromatógrafo.

#### 4.2.8.1.4 Linearidade

Com o objetivo de quantificar a quercetina liberada dos comprimidos no ensaio de dissolução, uma curva de calibração foi construída, em diferentes dias, contemplando concentrações de 0,05 a 10 µg/mL. A partir de uma solução mãe de quercetina 1000 µg/mL foram preparadas diluições 0,05, 0,15, 0,30, 0,6 1,5 3,0, 6,0 e 10 µg/mL utilizando o meio de dissolução como diluente. A equação da reta foi determinada através do estudo de regressão linear.

#### 4.2.8.1.5 Especificidade frente à composição do meio de dissolução

Uma alíquota do meio de dissolução foi injetada em triplicata no cromatógrafo a fim de garantir que a presença dos componentes do mesmo não interfere na detecção e quantificação de quercetina.

#### 4.2.8.1.6 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e LQ foram calculados através das fórmulas matemáticas preconizadas pelo ICH (2005), demonstradas no item 4.2.5.6, página 51, sendo utilizados os valores de desvio padrão e de inclinação das curvas de calibração construídas.

#### 4.2.8.2 Estudo da cinética de liberação

O ensaio de dissolução foi realizado para todas as formulações desenvolvidas, empregando aparelho de dissolução Varian com o aparato 1. O meio de dissolução selecionado foi saliva artificial (descrita no item 4.2.6.1, página 52, acrescida de polissorbato 20, 0,3 %, p/v).

Trezentos mililitros do meio foram transferidos para cubas do dissolutor. Após a estabilização da temperatura ( $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ ), um lado do comprimido foi umedecido com 50  $\mu\text{L}$  de saliva artificial sendo imobilizado no fundo da cesta através da pressão de bastão de vidro por 20 segundos. A rotação das cestas foi de 100 rpm. Alíquotas de 3 mL foram retiradas nos tempos determinados (0,5, 1, 2, 4, 8, 12 e 24h), filtradas com filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) colocada em *vial* de uso exclusivo do cromatógrafo líquido, prosseguindo com a análise quantitativa por CLAE. Para manutenção do volume do meio de dissolução a alíquota retirada para a análise foi imediatamente repostada com o mesmo meio de dissolução.

#### 4.2.8.3 Avaliação matemática dos perfis

Na avaliação da cinética de liberação do marcador a partir das formulações, os modelos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi foram empregados (equações 10, 11 e 12, respectivamente).

Equação 10

$$M_t/M_{\infty} = K t$$

Equação 11

$$\ln \left( M_{\infty} - M_t / M_{\infty} \right) = k t$$

Equação 12

$$M_t / M_{\infty} = k \sqrt{t}$$

Em que:

$M_t/M_{\infty}$ : quantidade liberada de fármaco;

K: constante de liberação

t: tempo;

$M_{\infty}$ : quantidade total de fármaco

#### 4.2.9 Análise estatística

Todos os estudos descritos foram realizados em triplicata, exceto quando especificado diferentemente. Os resultados obtidos foram avaliados empregando-se a análise de variância (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey.



## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 5.1 Caracterização das matérias-primas

A primeira etapa do trabalho constituiu na caracterização das matérias-primas utilizadas para a obtenção dos comprimidos. Esta etapa é de suma importância, pois a garantia de qualidade do produto final depende de matérias primas apropriadas, que estejam dentro dos parâmetros farmacopeicos. A realização destas análises permite, além de segurança no processo de desenvolvimento, a reprodutibilidade de cada formulação.

### 5.1.1 Caracterização do Extrato Seco Nebulizado (ESN)

Na caracterização do extrato seco nebulizado foram verificadas algumas propriedades consideradas relevantes para a manutenção e garantia da qualidade. Desta forma, foram determinados o teor de umidade e a quantificação do teor do marcador químico no ESN para estabelecer um perfil de qualidade.

#### 5.1.1.1 Teor de umidade do Extrato Seco Nebulizado

O conteúdo de umidade pode causar alterações de natureza diversa em preparações de origem vegetal. Teores elevados de umidade podem favorecer alterações de características físicas, tais como a distribuição granulométrica e fluxo de pós e também nas características químicas, interferindo na estabilidade de constituintes presentes (BOLTON, 1984; GUTERRES, 1990), bem como propiciar o crescimento de microrganismos.

Os valores de umidade encontrados para o ESN foram de  $2,47\% \pm 0,06$  (DPR 2,419%), estando de acordo com o limite preconizado pela Farmacopéia Brasileira IV (1988) para extratos secos que é inferior ou igual a 4%.

#### 5.1.1.2 Quantificação do teor do Marcador Químico no ESN –Quercetina

Como citado anteriormente neste trabalho, o marcador químico é de fundamental importância no desenvolvimento de produtos fitoterápicos, devido à sua

utilização como substância de referência durante a realização dos métodos analíticos de avaliação da qualidade das etapas intermediárias necessárias para a obtenção do produto final.

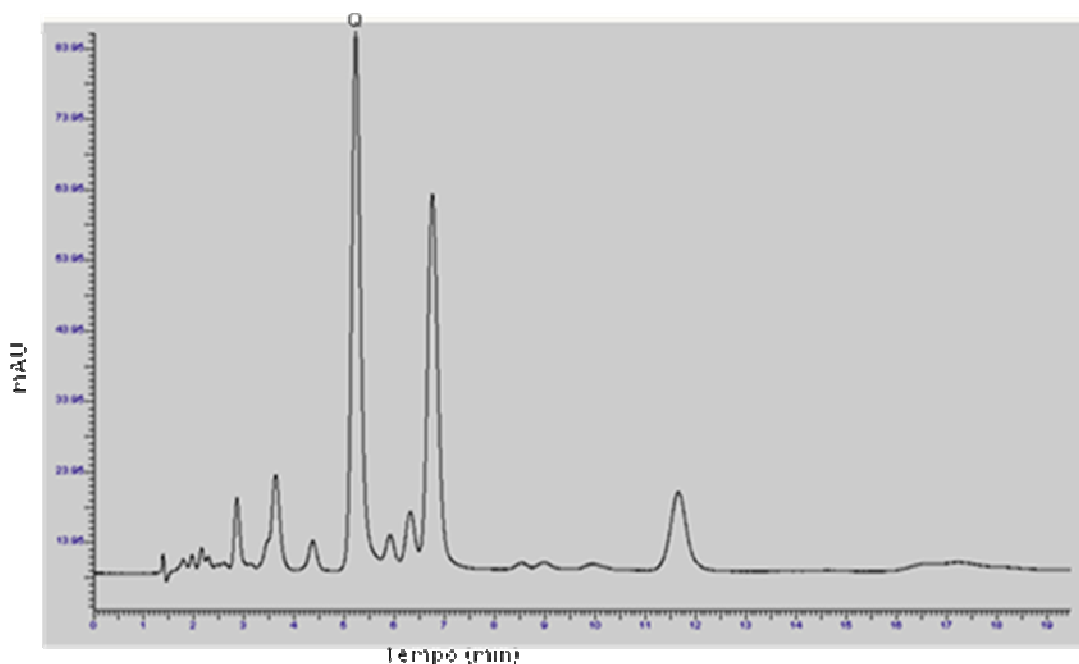
No caso da *Achyrocline satureioides*, os flavonóides, mais especificamente a quercetina, vêm sendo utilizados como marcadores químicos por sua abundância e disponibilidade de metodologia de detecção e doseamento. Adicionalmente, a fração flavonoídica está diretamente relacionada à atividade farmacológica da marcela, de forma que todas as operações realizadas devem garantir a manutenção da qualidade e integridade destes compostos.

De Souza e colaboradores (2002) desenvolveram e validaram um método de cromatografia líquida para a separação das três principais substâncias constituintes da *A. satureioides* (quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina), alcançando, pela primeira vez, a separação dos últimos dois constituintes, o que resultou na inserção deste procedimento na Farmacopéia Brasileira quarta edição (2001).

Com o objetivo de simplificar esse método, visando especificamente à separação da quercetina, uma técnica por cromatografia líquida de alta eficiência foi desenvolvida. Esta metodologia apresenta um tempo de análise consideravelmente menor do que o método original (de 65 para 20 minutos) e utiliza uma coluna cromatográfica mais viável economicamente, o que resulta em economia de tempo e quantidade de fase móvel utilizada no ensaio.

As condições cromatográficas utilizadas para a quantificação do teor do marcador químico no ESN foram: fase estacionária: pré-coluna Phenomenex ODS (4,0 x 3,0mm) acoplada a uma coluna Zorbax ODS (5 µm – 150 mm x 4,6 mm i.d.); fase móvel: metanol:solução de ácido fosfórico 1% (55:45, v/v); condições de operação: modo isocrático; fluxo: 1,0 mL.min<sup>-1</sup>; detecção: 369 nm. A validação do método para a quantificação do ESN e comprimidos está exposta no item 5.3.2, página 79.

O perfil cromatográfico típico do ESN de *Achyrocline satureioides* está apresentado na figura 7. Nas condições cromatográficas utilizadas, a quercetina apresentou um tempo de retenção em torno de 5,20 minutos. O teor encontrado de quercetina no ESN, analisado por CLAE, foi de 18,78 mg/g ( $\pm 0,07$ ; n=3).



**Figura 7:** Perfil cromatográfico do ESN de *Achyroclines satureioides* em CLAE. Fase móvel: metanol:ácido fosfórico 1% (55:45, v/v), fluxo 1 mL/min, detecção: 369 nm.

### 5.1.2 Caracterização dos Excipientes

Excipientes farmacêuticos constituem elementos de elevado destaque na formulação dos medicamentos, uma vez que exercem efetivo papel na garantia de obtenção da forma farmacêutica adequada ao uso e ao efeito terapêutico desejado, regendo e influenciando de maneira significativa a cedência do princípio ativo contido no medicamento (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Os excipientes selecionados para o estudo de pré-formulação foram caracterizados através de análise por espectroscopia no infravermelho e teor de umidade.

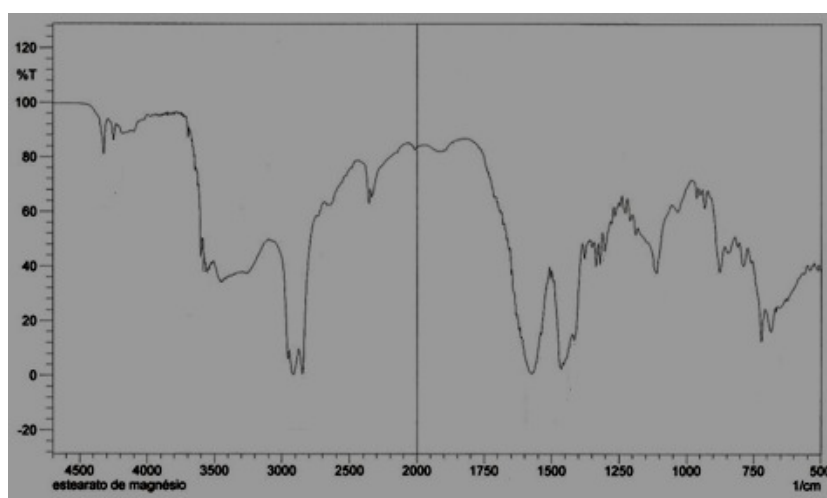
### 5.1.2.1 Espectroscopia no infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do infravermelho fornece uma impressão digital, única para cada composto. Por essa razão, é um dos métodos mais empregados para identificação de substâncias, pois é capaz de diferenciar substâncias por menores que sejam as diferenças estruturais, com exceção dos isômeros ópticos. A partir dos espectros podem-se identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes na amostra (PAVIA et al., 2001; WATSON, 2005).

No presente trabalho, o objetivo da realização desse ensaio foi avaliar a autenticidade das matérias-primas utilizadas na produção das formulações.

#### 5.1.2.1.1 Estearato de Magnésio

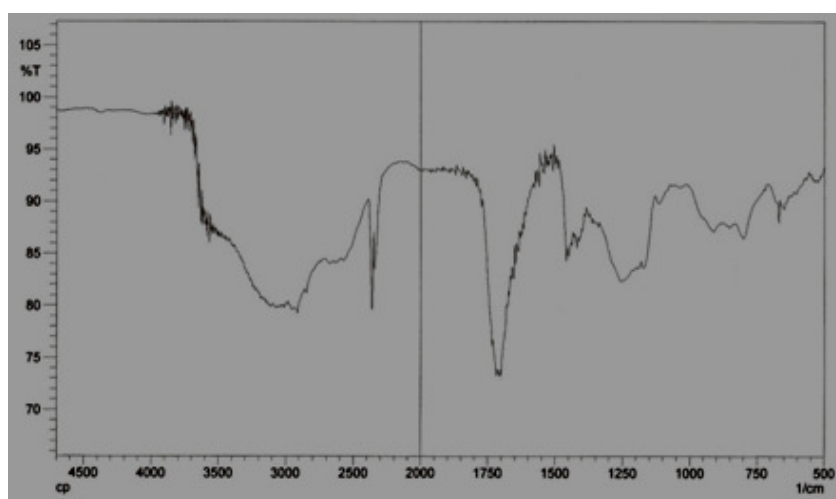
Através do espectro obtido para o estearato de magnésio foram observadas as principais bandas de absorção. Deformações axiais das ligações O-H e C-H em  $2900-2800\text{ cm}^{-1}$ . Em  $1550\text{ cm}^{-1}$ , foi observada a região de sobreposição das deformações axiais assimétricas do íon carboxilato, do estearato e de palmitato. Em  $1500$ , deformação angular da ligação C-H. Em  $723,4\text{ cm}^{-1}$  observa-se deformação angular assimétrica da ligação C-H. O conjunto de resultados confirma a autenticidade da matéria-prima, cujo espectro na região do infravermelho está representado na figura 8.



**Figura 8:** Espectro na região do infravermelho do Estearato de Magnésio em brometo de potássio

#### 5.1.2.1.2 Carbopol®

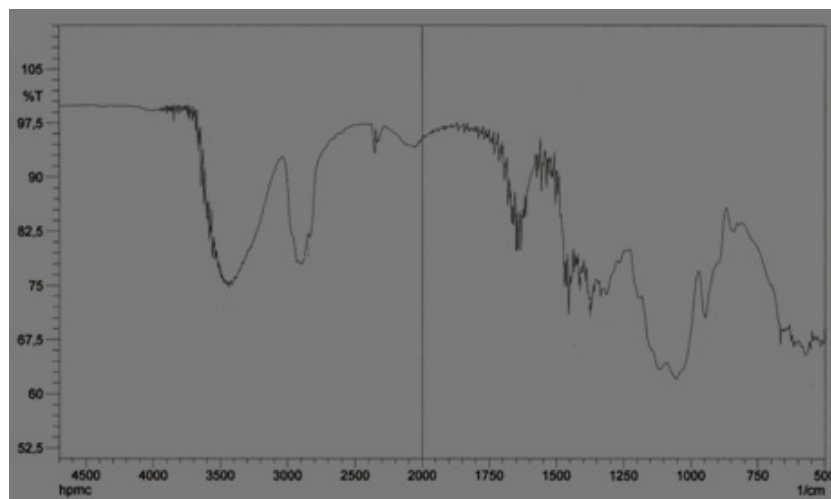
A análise por espectroscopia no infravermelho permitiu observar as principais bandas características dos grupos funcionais presentes na estrutura do Carbopol®. Em  $3400 - 2500 \text{ cm}^{-1}$  foi observada uma banda larga referente ao estiramento da ligação O-H do ácido carboxílico, que é confirmado pela presença da banda de estiramento de C=O na região de  $1725 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ ; banda na região entre  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  correspondente ao estiramento da ligação C-H, apesar da sobreposição da banda da hidroxila;  $1440 - 1295 \text{ cm}^{-1}$  refere-se à banda de combinação do estiramento de C-O e a deformação angular de O-H; em  $1345 - 1180 \text{ cm}^{-1}$ , uma banda comum em espectros de ácidos graxos de cadeia longa, referente à deformação angular  $\text{CH}_2$ . O espectro do Carbopol® na região do infravermelho está representado na figura 9.



**Figura 9:** Espectro na região do infravermelho do Carbopol® em brometo de potássio

#### 5.1.2.1.3 Hidroxipropilmetilcelulose

As principais bandas referentes ao hidroxipropilmetilcelulose estão associadas com o estiramento O-H entre  $3600 - 3430 \text{ cm}^{-1}$ , C-H em  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ , carboxila da unidade de glicose que compõe a celulose em  $1645 \text{ cm}^{-1}$  e C-O-C na região  $1300 - 900 \text{ cm}^{-1}$ . O espectro da HPMC na região do infravermelho está representado na figura 10.

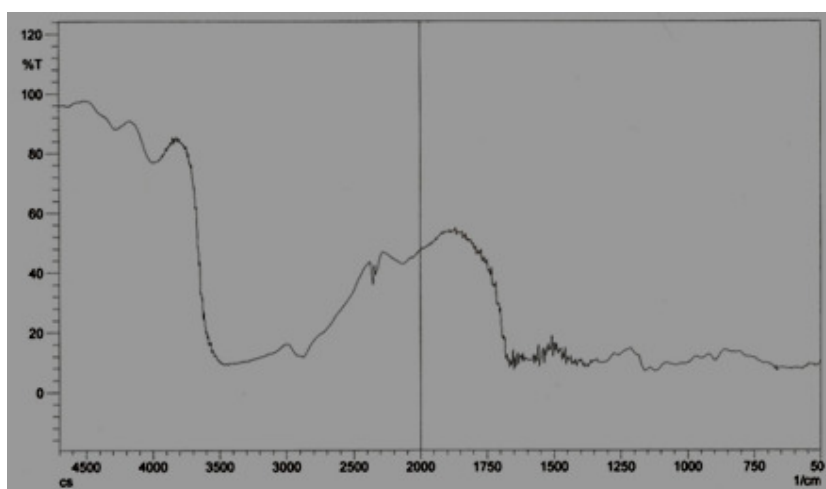


**Figura 10:** Espectro na região do infravermelho do HPMC em brometo de potássio

#### 5.1.2.1.4 Quitosana

A banda na região de  $3400\text{ cm}^{-1}$ , intensa e larga, resulta do estiramento axial da ligação entre oxigênio e hidrogênio do grupo OH presente na molécula de quitosana. Esta banda aparece sobreposta à banda de estiramento N-H. A banda em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento assimétrico da ligação C-H.

Visando a obtenção de um produto em que a transposição de escala seja facilitada, a quitosana utilizada neste trabalho foi produzida no Brasil. Sendo um produto natural, o grau de pureza da mesma é bastante dependente do lote. Desta forma, a visualização das bandas localizadas na região abaixo de  $2000\text{ cm}^{-1}$  ficou prejudicada. O espectro da quitosana na região do infravermelho está representado na figura 11.



**Figura 11:** Espectro na região do infravermelho da Quitosana em brometo de potássio

### 5.1.2.2 Teor de umidade

A importância da análise do teor de umidade dos excipientes reside na manutenção da qualidade do material no que tange à estabilidade química e microbiológica. Além disso, o teor de umidade expressa, indiretamente, problemas de manuseio da matéria-prima durante o armazenamento e transporte.

Os teores de umidade dos excipientes, apresentados na tabela 1, estão dentro dos limites preconizados pela Farmacopéia Britânica (2007), com exceção do Carbopol<sup>®</sup>, que apresenta um teor umidade superior ao especificado nesta Farmacopéia. Este valor de umidade pode ser explicado pelo armazenamento prévio em ambiente desprovido de controle de temperatura e umidade. Apesar deste resultado, o Carbopol<sup>®</sup> foi utilizado neste estudo sem qualquer manipulação prévia. No entanto, para evitar erros de análise devido a este desvio de qualidade, os cálculos foram ajustados sempre que necessário.

**Tabela 1:** Teor de umidade dos excipientes utilizados para a confecção dos comprimidos

<b>Excipiente</b>	<b>Especificação (Farm. Britânica)</b>	<b>Teor de umidade (% ± DP) (DPR)</b>
Hidroxipropilmetilcelulose	≤ 10,0%	7,16 ± 0,057 (0,797)
Quitosana	≤ 10,0%	5,69 ± 0,001 (0,021)
Carbopol <sup>®</sup>	≤ 3,0%	6,56 ± 0,056 (0,852)
Estearato de Magnésio	≤ 6,0%	3,66 ± 0,057 (1,563)

## 5.2 Delineamento experimental 1, visando a preparação de comprimidos por compressão direta

Com vistas a otimizar uma formulação com características adequadas de mucoadesão, capacidade de controle de liberação do marcador químico e adequação aos requisitos da via bucal, foi elaborado um planejamento fatorial envolvendo a utilização dos 3 polímeros mucoadesivos, HPMC, Carbopol<sup>®</sup> e quitosana, isoladamente ou em misturas binárias (1:0, 1:2, 1:1, 2:1, 0:1), visando



avaliar inicialmente as características tecnológicas das misturas e sua adequação à obtenção de comprimidos. Como comentado anteriormente, estes polímeros apresentam diferentes características iônicas (não-iônico, aniônico e catiônico, respectivamente) e, portanto, podem interagir diferentemente com a mucosa bucal.

Para a definição quantitativa das formulações, a primeira dificuldade foi estabelecer a quantidade do ESN na formulação, visto que esse trabalho é pioneiro na incorporação do ESN de marcela em uma forma farmacêutica sólida mucoadesiva para via bucal e que não há registros na literatura sobre a quantidade necessária do ESN de marcela para que haja uma ação farmacológica contra o vírus do herpes. Estudos anteriores visando confirmar a concentração anti-herpética do extrato padronizado por placa de lise (Luciane Savi, tese de doutorado em andamento, dados confidenciais visando patenteamento), apesar de permitirem estabelecer uma correlação com o fármaco de escolha, o aciclovir, não foram suficientes para determinar uma concentração de partida, uma vez que não existem formulações deste fármaco para esta forma de administração – comprimidos para via bucal. Desta forma, a quantidade de ESN nas formulações foi eleita em 100 mg, definida de acordo com o volume do pó em relação às características da via de administração, a qual não permite um comprimido com elevado tamanho (especialmente no que se refere à altura), considerando a presença dos polímeros mucoadesivos. A relação entre o extrato seco nebulizado e os excipientes (isolados ou blendas) foi de 1:1, resultando em 12 diferentes formulações, apresentadas na tabela 2. A cada formulação foi adicionado 1 % de estearato de magnésio como lubrificante.

A literatura disponibiliza inúmeros exemplos de produção de comprimidos bucais pelo método da compressão direta (PERIOLI et al., 2004; MOHAMMADI-SAMANI; BAHRI-NAJAFI; YOUSEFI, 2005; ELL-SAMALIGY; YAHIA; BASALIOUS, 2004; GIANNOLA et al., 2007), tendo sido este o método selecionado inicialmente para a obtenção dos comprimidos. No entanto, para que possa ser utilizada esta técnica de compressão, os pós devem possuir fluxo livre e propriedades coesivas que os tornem passíveis de serem comprimidas diretamente em máquinas de comprimir (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007). Considerando que extratos vegetais

de maneira geral carecem de propriedades satisfatórias de reologia e de compressibilidade que permitam o processo de fabricação (SOARES et al., 2002), um estudo para determinação das características de fluxo e compressibilidade das misturas foi conduzido.

**Tabela 2:** Delineamento experimental 1, visando a preparação de comprimidos por compressão direta

	Composição % (p/p)				Est. Mg
	HPMC	CP	CS	ESN	
1	50	0	0	50	1
2	0	50	0	50	1
3	0	0	50	50	1
4	25	25	0	50	1
5	25	0	25	50	1
6	0	25	25	50	1
7	17	33	0	50	1
8	17	0	33	50	1
9	33	17	0	50	1
10	33	0	17	50	1
11	0	33	17	50	1
12	0	17	33	50	1

### 5.2.1 Caracterização tecnológica das formulações: fluxo e compressibilidade

Os estudos para a caracterização tecnológica das misturas foram realizados na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob supervisão da Profa. Dra. Letícia Scherer Koester.

As propriedades avaliadas foram o ângulo de repouso e a densidade bruta e de compactação, permitindo estimar o fator de Hausner, o índice de compressibilidade (IC) e de compactabilidade (C) das misturas. Os resultados deste estudo estão expressos na tabela 3.

A determinação da densidade aparente e de compactação foi usada para a previsão das características de compressibilidade dos materiais utilizados. A densidade bruta é a razão entre o peso do pó e o volume livremente ocupado por

este. A densidade de compactação é a razão entre o peso do pó e o volume final ocupado por este depois de submetido a quedas em condições controladas. Através da medida destas propriedades é possível obter o fator de Hausner (FH), que é o quociente entre a densidade de compactação e densidade bruta. Esta relação depende do coeficiente de fricção interparticular, tamanho e forma das partículas, bem como da metodologia empregada na determinação das densidades. As misturas cujo FH for inferior a 1,25 são facilmente compressíveis, ao contrário daquelas que apresentam valor superior. Como pode ser observado na tabela 3, todas as misturas obtiveram FH superior a 1,25.

**Tabela 3:** Resultados da caracterização tecnológica das formulações

	% dos Polímeros			Dados experimentais					
	HPMC	CP	CS	DB* (g/mL)	DC* (g/mL)	FH*	IC* (%)	C* (mL)	Ângulo de Repouso** (°)
1	50	0	0	0,40	0,56	1,39	28,00	2,30	25,84
2	0	50	0	0,28	0,39	1,38	27,65	3,60	59,17
3	0	0	50	0,53	0,69	1,32	24,21	1,50	25,84
4	25	25	0	0,33	0,47	1,40	28,33	3,57	62,17
5	25	0	25	0,48	0,67	1,40	28,57	2,00	28,17
6	0	25	25	0,37	0,50	1,35	25,93	2,83	61,34
7	17	33	0	0,31	0,43	1,39	28,13	3,50	63,00
8	17	0	33	0,48	0,66	1,38	27,62	1,90	24,67
9	33	17	0	0,34	0,53	1,53	34,48	4,00	59,17
10	33	0	17	0,43	0,61	1,40	28,70	1,80	23,50
11	0	33	17	0,34	0,48	1,38	27,59	3,00	55,50
12	0	17	33	0,42	0,59	1,41	29,17	2,50	58,60

Nota: composição da mistura: 50% de polímeros; 50 % de ESN e 1% de estearato de Mg. \* DPR < 2,71 % \*\* DPR < 8,78 %

Da mesma forma que o fator de Hausner (FH), o índice de compressibilidade ou índice de Carr e a compactabilidade são parâmetros vinculados à capacidade de empacotamento de materiais particulados. Valores adequados para estes índices podem indicar materiais com características de empacotamento mais estáveis, assim influenciando positivamente na reprodutibilidade de enchimento das câmaras

de compressão e na operação de compressão (CARR, 1965; WELLS, 1988; THOMAS; POURCELOT, 1991).

O IC mede indiretamente o fluxo e empacotamento dos pós. Quanto menor o IC, melhor o fluxo e o empacotamento (THOMAS; POURCELOT, 1991). Segundo Staniforth (2005), valores de IC de até 15% originam um escoamento adequado indicando um empacotamento regular; IC entre 18 e 21% indica um fluxo tolerável; de 23 a 35% um fluxo pobre; e, finalmente, valores de IC acima de 40% são obtidos em misturas com fluxo extremamente fraco. Como pode ser visualizado na tabela 3, todos os valores de IC obtidos para as misturas estão compreendidos entre 24 e 35%. Desta forma, pode ser esperado destas misturas um fluxo e capacidade de empacotamento deficientes.

A compactabilidade (C) provê informações sobre o comportamento do pó quando este é submetido à movimentação indicando maior ou menor facilidade de rearranjo das partículas e ocupação de espaço e infere a respeito do comportamento compressional do produto (SOARES; PETROVICK, 1999). Valores superiores a 20 mL sugerem que o pó apresenta razoável propriedade de fluidez (GUYOT et al., 1995). O baixo valor obtido para as misturas, de 1,5 a 4 mL, indica uma compactabilidade desfavorável, apontando para potenciais problemas durante a compressão.

Para finalizar o estudo de caracterização tecnológica das misturas, o ângulo de repouso das misturas foi determinado. Esta determinação se dá pelo escoamento de um sólido sobre uma superfície horizontal (base), formando uma figura cônica. O ângulo formado entre a superfície lateral do pó e a base está relacionado com a fricção interna ou coesão entre as partículas e é denominado ângulo de repouso. Materiais particulados apresentando valores de ângulo de repouso inferiores a 20° caracterizam-se como materiais de fluxo livre; entre e 20 e 30°, o tipo de fluxo pode ser considerado bom; o fluxo pode ser considerado tolerável para materiais que formam ângulos entre 30 e 34°; finalmente, ângulos de repouso superiores a 40° indicam materiais com fluxo muito pobre (WELLS, 2005).

Em relação ao ângulo de repouso, podem ser observadas claras diferenças entre as misturas. As formulações 1, 3, 5, 8 e 10, que contêm HPMC e/ou CS, em todas as proporções avaliadas, apresentaram um ângulo entre 23 e 29, indicando uma capacidade de fluxo adequada. Estes resultados são coerentes com outros trabalhos publicados que demonstram que o HPMC possui boas propriedades de fluxo, sendo geralmente empregado na técnica de compressão direta (CHIAPETTA, 2006; VIRIDÉN; WITGREN; LARSSON, 2009; WU et al., 2007). Apesar de não haver na literatura estudos que apresentem uma caracterização detalhada do comportamento na compressão e compactação da quitosana, foi demonstrado que este polímero reduz a fricção durante a produção de comprimidos (PICKER-FREYER, 2006).

Por outro lado, pode ser observado que todas as misturas que contêm Carbopol<sup>®</sup> (formulações 2, 4, 6, 7, 9, 11 e 12) apresentam um ângulo de repouso elevado, indicando fluxo deficiente. Estes resultados podem estar relacionados com o tamanho de partícula do Carbopol<sup>®</sup> (2 – 6 µm, KIBBE, 2000). Da mesma forma que o ESN, que apresenta um tamanho de partícula aproximado de 15 µm (PETROVICK, 2006), o reduzido tamanho de partícula do Carbopol<sup>®</sup> não contribui para a melhoria das características de fluidez, como observado nas misturas que contêm HPMC e/ou CS. Segundo Staniforth (2005), o fluxo está diretamente relacionado com o tamanho das partículas. Partículas finas possuem uma massa muito elevada sendo mais coesivas que as partículas grosseiras. Assim, à medida que o tamanho diminui, os pós tendem a serem mais coesivos e com problemas de fluxo. Os pós com tamanho de partícula inferior a 10 µm, em geral, são extremamente coesivos e resistem ao fluxo por ação da gravidade.

Apesar do resultado interessante obtido para algumas formulações no que se refere ao ângulo de repouso, o conjunto de resultados obtidos evidenciou que todas as formulações apresentam deficiências de fluxo e de compactabilidade, sendo, desta forma, consideradas inadequadas para serem comprimidas pelo método de compressão direta. Foi planejado, então, um novo estudo de formulação, desta vez utilizando como método de preparação a granulação por via seca.

### 5.3 Delineamento experimental 2, visando a preparação de comprimidos por granulação via seca

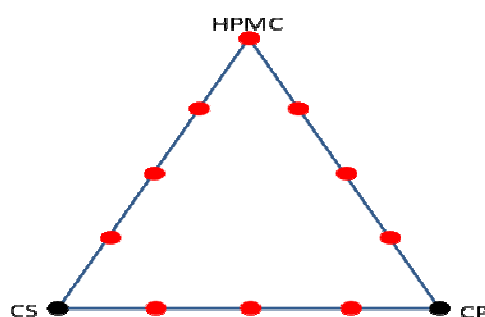
O emprego da operação de granulação tem a finalidade de modificar as características do complexo farmacêutico, transformando partículas de pós cristalinos ou amorfos em agregados sólidos mais ou menos resistentes e porosos, denominados granulados (SOARES; PETROVICK, 1999). Esta transformação ajuda a melhorar as propriedades de fluxo, que são requisitos necessários para alcançar escoamento adequado durante a alimentação da máquina compressora e no enchimento das matrizes de compressão da mistura do ESN com os polímeros e/ou suas blendas.

Para o planejamento dos experimentos e avaliação dos resultados, utilizou-se um plano de experimentação estatístico que constitui uma maneira tecnicamente ótima, viável e economicamente eficaz na obtenção e exploração de informações. O planejamento estatístico de experimentos é uma prática já aplicada no desenvolvimento de formulações farmacêuticas, com o objetivo de produzir formas farmacêuticas com propriedades adequadas. A utilização de um delineamento experimental é útil para resolver problemas tecnológicos ou fontes de variáveis, mais ou menos aleatórias (WEKEMA, 1996).

Muitos produtos são feitos com a mistura de vários componentes. Produtos farmacêuticos e químicos, tintas, alimentos são alguns exemplos. Para tais produtos, o interesse é determinar qual é a proporção dos componentes que conduz a um resultado desejado em termos de uma variável que caracteriza a qualidade do produto. Quando não se sabe preliminarmente qual é a proporção ideal de cada componente, devemos realizar experimentos. Nesses experimentos, são arbitradas várias combinações de proporções dos componentes e então são observados os valores correspondentes do controle de qualidade. Estes valores são denominados respostas do experimento.

Para esse delineamento experimental foi utilizado o delineamento para misturas *D-optimal*. Em experimentos envolvendo mistura, a soma das proporções

dos componentes é sempre igual a 100%. Ao modificar a formulação no sentido de alterar as propriedades de uma determinada mistura em estudo, as novas proporções devem continuar obedecendo a essa restrição. Este delineamento foi proposto utilizando polímeros sozinhos (100%) ou misturas binárias de polímeros (25, 50 e 75%). Este desenho está mais bem representado pela figura 12. Cabe ressaltar que em certos experimentos pode haver a necessidade de restringir a proporção de um ou mais componentes, que, por motivos tecnológicos, os tornam inviáveis de realizar. Este foi o caso de duas formulações sugeridas pelo *software*. As formulações que continham 100% de Carbopol® e 100% de quitosana foram retirados do desenho.



**Figura 12:** Sistema de seleção dos pontos das blendas dos polímeros.

Para que um delineamento experimental obtenha resultados confiáveis é preciso que o desenho possua triplicatas e duplicatas. Assim, o modelo se torna robusto, ajustado, podendo estimar o desvio padrão das respostas. O delineamento proposto conduziu à preparação de 10 formulações sendo que o vértice foi realizado em triplicata e os pontos medianos entre as blendas foram feitos em duplicata. O delineamento está detalhado na tabela 4.

Os compactados para a granulação foram preparados em compressora excêntrica apresentando espessura na faixa de 3 a 4 mm de modo a facilitar a operação de desagregação (PRISTA, 1995). A dureza, por sua vez, foi ajustada na faixa de 90N. Este valor foi previsto para suportar a sua quebra durante a granulação no granulador oscilatório e para minimizar o aparecimento de partes escuras nos compactados.

**Tabela 4:** Delineamento experimental 2, visando a preparação de comprimidos por granulação via seca

Formulações	% DOS CONSTITUINTES NAS FORMULAÇÕES					
	HPMC	CP	CS	ESN	Est. de Mg	CP
1	39	0	0	50	1	10
2	19,5	19,5	0	50	1	10
3	26	13	0	50	1	10
4	13	26	0	50	1	10
5	19,5	19,5	0	50	1	10
6	39	0	0	50	1	10
7	0	19,5	19,5	50	1	10
8	0	26	13	50	1	10
9	0	13	26	50	1	10
10	0	19,5	19,5	50	1	10
11	19,5	0	19,5	50	1	10
12	39	0	0	50	1	10
13	26	0	13	50	1	10
14	19,5	0	19,5	50	1	10
15	13	0	26	50	1	10

Esta última consideração foi observada durante testes de compactação dos comprimidos onde, à medida que a força de compressão foi aumentada, manchas escuras foram observadas nos comprimidos. Estas manchas também foram observadas no estudo realizado por Petrovick (2006), que demonstrou que esta alteração não implica em diferenças nos perfis dos flavonóides ou no aparecimento de picos de degradação.

Os granulados foram produzidos em granulador oscilatório com malha de 2  $\mu\text{m}$  e posteriormente tamizados. A escolha da faixa granulométrica para a confecção dos comprimidos foi baseada no trabalho realizado por Soares e colaboradores (2005), que compreende a fração entre 250 a 1000  $\mu\text{m}$ .

Os rendimentos da operação de granulação nas diferentes formulações obtiveram uma variação de 64,65 a 81,77 %, como pode ser observado na tabela 5. Tecnicamente, quanto maior o rendimento da granulação, menos ciclos operacionais são necessários e, com isso, o produto sofre menor estresse mecânico.



Essa diferença na variação percentual de rendimento da granulação por via seca pode ser explicada de acordo com as propriedades das misturas dos polímeros utilizados (densidade bruta e de compactação). Dependendo das blendas poliméricas, utilizadas para a confecção dos comprimidos, a força de compressão foi aumentada para que houvesse a formação dos briquetes, resultando em diferentes rendimentos para as diferentes misturas.

Testes preliminares de mucoadesividade mostraram que a adição de Carbopol® como fase externa aos granulados incrementou a capacidade mucoadesiva dos comprimidos. Desta forma, antes da compressão, 10% (p/p) de Carbopol® foi misturado ao granulado (para cada comprimido, 20 mg de Carbopol® foram adicionados a 180 mg de granulado).

**Tabela 5:** Rendimento (%) da operação da granulação via seca.

<b>Formulações</b>	<b>Rendimento %</b>
1	75,05
2	80,00
3	69,75
4	78,38
5	81,77
6	76,41
7	78,18
8	74,60
9	74,85
10	79,34
11	64,65
12	74,44
13	71,97
14	71,26
15	66,92

A produção dos comprimidos foi realizada em máquina excêntrica com acionamento manual da máquina de compressão, após o ajuste manual da força de compressão e do volume de enchimento da câmara de compressão, objetivando a

obtenção de comprimidos com dureza superior a 90 N e considerando um peso médio de 200mg.

Com o método de granulação por via seca foram obtidas preparações adequadas para compressão do ponto de vista tecnológico, com boa fluidez e não aderência aos punções da máquina de compressão, bem como capazes de produzir comprimidos com propriedades físicas adequadas.

### 5.3.1 Caracterização dos comprimidos

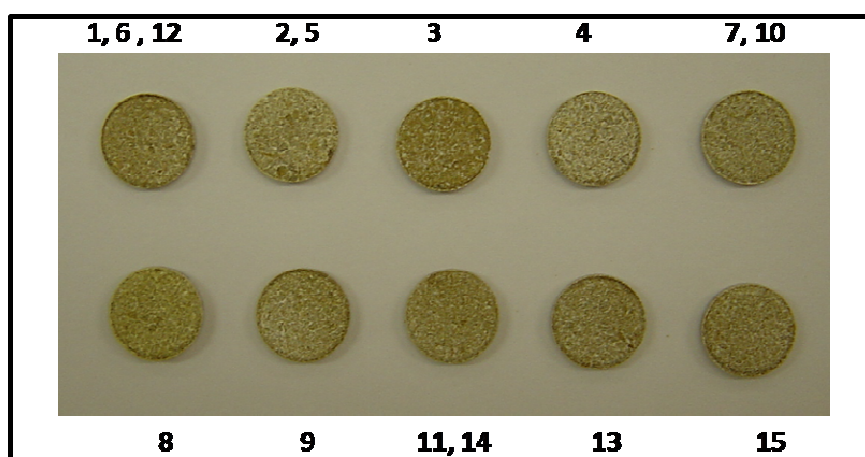
Os comprimidos obtidos através de granulação via seca foram avaliados de acordo com os critérios preconizados pela Farmacopéia Brasileira (1988) e os resultados estão expressos na tabela 6.

**Tabela 6:** Resultados da caracterização das formulações

Formulações	Peso médio (mg ± DP)	Ensaio	
		Dureza (Kgf ± DP)	Friabilidade (%)
1	200,45 ± 4,33	10,78 ± 0,74	0,17
2	198,15 ± 3,66	11,19 ± 0,72	0,00
3	196,85 ± 6,48	11,72 ± 0,52	0,03
4	199,55 ± 5,33	15,97 ± 0,61	0,00
5	197,50 ± 4,81	11,13 ± 0,51	0,13
6	195,75 ± 5,12	11,64 ± 0,49	0,05
7	193,00 ± 4,10	12,83 ± 0,58	0,13
8	200,85 ± 3,83	13,93 ± 0,56	0,12
9	198,65 ± 3,91	12,61 ± 0,61	0,17
10	199,10 ± 6,25	13,23 ± 0,55	0,25
11	196,30 ± 3,84	9,26 ± 0,46	0,08
12	194,90 ± 4,56	10,41 ± 0,49	0,10
13	199,95 ± 4,29	10,92 ± 0,62	0,10
14	200,90 ± 5,04	9,45 ± 0,46	0,17
15	195,05 ± 4,76	8,41 ± 0,40	0,15

Os comprimidos avaliados visualmente possuem coloração não homogênea, predominante amarelo pardo, sem rugosidades. A figura 13 exhibe as diferentes formulações.

Todas as formulações apresentaram uma espessura de cerca de 2,05 mm e 10 mm de diâmetro. Este parâmetro é importante uma vez que se destina à aplicação sobre a mucosa bucal e um dos requisitos para essa via de administração é o tamanho da forma farmacêutica, a qual deve ser pequena e plana (SUDHAKAR; KUOTSU; BANDYOPADHYAY, 2006).



**Figura 13:** Aspecto macroscópico dos comprimidos de *Achyrocline satureioides* obtidos por granulação via seca.

O peso médio de todas as formulações variou entre 193 e 201 mg, estando de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira, que permite uma variação de  $\pm 7,5\%$  (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

A dureza é a resistência do comprimido ao esmagamento ou à ruptura sob pressão radial. Segundo a Farmacopéia Brasileira (1988), a dureza mínima aceitável é 3 Kgf. Como pode ser observado na tabela 9, a dureza média das formulações variou entre 8 e 16 kgf. As diferenças encontradas entre as formulações podem ser explicadas de acordo com as misturas dos polímeros nas diferentes formulações. Apesar de selecionar a faixa granulométrica, para a confecção dos comprimidos, entre 250 a 1000  $\mu\text{m}$ , acredita-se que os comprimidos obtidos a partir dos granulados que contêm Carbopol<sup>®</sup> em maior quantidade apresentaram um menor

tamanho. A dureza mais elevada pode ser atribuída à maior área superficial apresentada por esses granulados menores, o que promoveu uma maior área de ligações interparticulares, permitindo a obtenção de comprimidos mais resistentes (CURY; SILVA JUNIOR; CASTRO, 2008).

A friabilidade pode ser conceituada como a falta de resistência dos comprimidos à abrasão, quando submetidos à ação mecânica de aparelhagem específica. Consideram-se aceitáveis os comprimidos com perda igual ou inferior a 1,5% do seu peso. As formulações desenvolvidas apresentam valores inferiores ao especificado (entre 0,00 e 0,25%), sendo consideradas aprovadas segundo os critérios farmacopeicos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

#### 5.3.1.1 Teor de quercetina nos comprimidos

Apesar da disponibilidade de uma metodologia farmacopeica de separação e quantificação dos flavonóides da marcela e de haver sido utilizada uma metodologia simplificada para o doseamento da quercetina no ESN, ambas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência, não foram encontrados relatos sobre nenhum método analítico para o doseamento da quercetina em comprimidos mucoadesivos. Desta forma, foi conduzido um estudo de validação de uma metodologia analítica com esta finalidade.

A validação deve garantir por meio de estudos experimentais que o método atenda às exigências das aplicações analíticas assegurando assim a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). Os parâmetros de validação selecionados para a quantificação do marcador químico no comprimido seguiram as normas de validação conforme critérios estabelecidos pelo ICH (2005) e pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Deste modo, foram avaliados os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de detecção e quantificação.

### 5.3.2 Validação da metodologia para o doseamento do marcador químico nos comprimidos

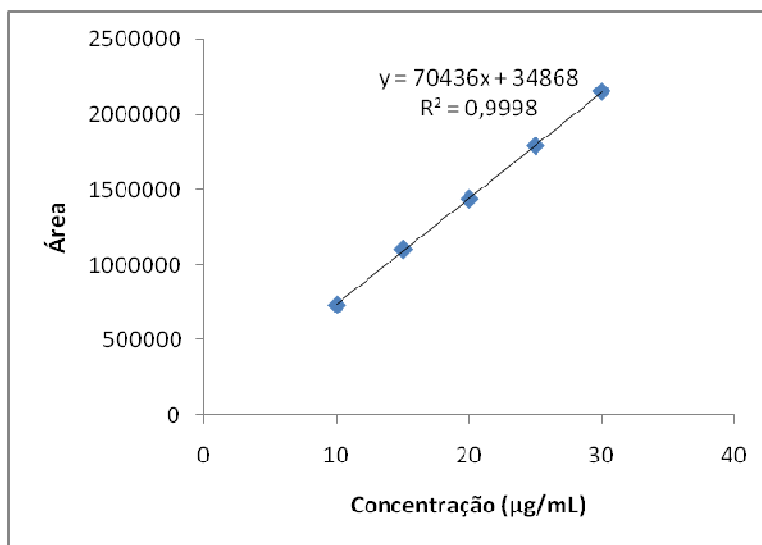
A linearidade pode ser definida como a capacidade do método de fornecer resultados que são diretamente proporcionais à concentração da substância na amostra, dentro de um intervalo específico. Esta avaliação é realizada através da elaboração de uma curva padrão e da análise estatística da linearidade através de análise de regressão linear (BRASIL, 2003).

A faixa de linearidade do método foi avaliada através da elaboração de três curvas padrão contemplando concentrações de 10 a 30 µg de quercetina por mililitro de fase móvel (metanol:solução de ácido fosfórico 1% 55:45, v/v). Os valores médios de área para cada concentração, bem como seus respectivos desvios padrão e desvios padrão relativos estão expressos na tabela 7.

**Tabela 7:** Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de quercetina por CLAE (n=3).

<b>Faixa de Linearidade (µg/mL)</b>	<b>Área do Pico (Média ± DP)</b>	<b>DPR (%)</b>
10	734313 ± 3078	0,42
15	1103325 ± 5796	0,53
20	1437929 ± 6917	0,48
25	1791004 ± 8145	0,45
30	2151375 ± 4269	0,20

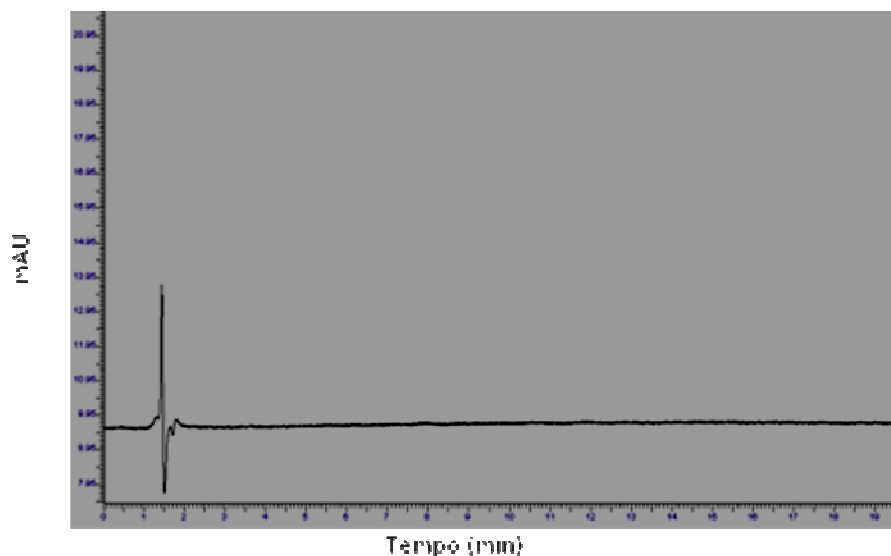
Dentro dessa faixa, o método demonstrou-se linear, apresentando um coeficiente de correlação de  $R^2 = 0,9998$ , indicando uma ótima correlação entre os dados, ou seja, o modelo explica 99,98% da variação da área dos picos. A figura 14 representa a equação da reta obtida por regressão linear, bem como a curva de calibração média utilizada na conversão entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidas e a concentração dos analitos.



**Figura 14:** Curva de calibração média de Quercetina obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

A avaliação estatística dos valores obtidos na curva padrão foi realizada por análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos demonstraram que a linearidade é estatisticamente válida, pois a curva apresentou regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ), com valor de  $F_{\text{calculado}}$  de 15994,69 e  $F_{\text{crítico}}$  igual a  $1,089 \times 10^{-6}$ . Ainda, não foi detectada a presença de erro sistemático constante, uma vez que a reta passa estatisticamente pelo zero (Apêndice A). Assim, o método apresentou linearidade de resposta na faixa de 10 a 30 µg/mL.

A especificidade de um método indica sua capacidade em avaliar sem equívoco o analito de interesse, mesmo em presença de outras substâncias como impurezas, produtos de degradação e excipientes (ICH, 2005). Neste estudo, para a avaliação da especificidade do método, uma mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos foi submetida ao mesmo procedimento de extração dos comprimidos contendo ESN, descritos no item 4.2.4.5.1 (Materiais e métodos, página 48). A solução extrativa resultante foi injetada no cromatógrafo a fim de demonstrar que nenhum excipiente absorve no mesmo comprimento de onda utilizado para as análises do marcador químico (quercetina,  $\lambda = 369$  nm). Com base no cromatograma apresentado na figura 15, observa-se que não há interferência dos excipientes da formulação indicando que o método é específico a que se destina.

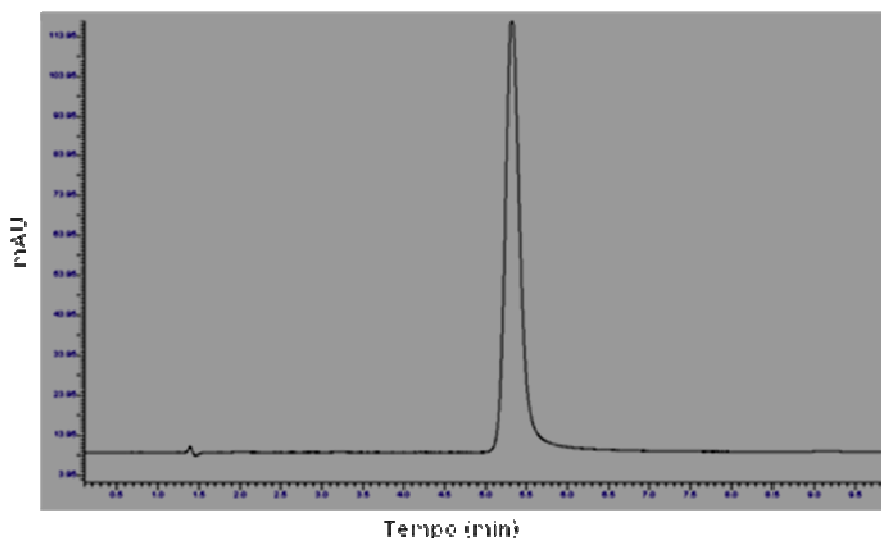


**Figura 15:** Cromatograma típico obtido por CLAE da mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos

A precisão do método é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). A repetibilidade e a precisão intermediária foram caracterizadas por coeficientes de variação inferiores a 0,27 e 0,72 %, respectivamente, demonstrando que o método proposto é preciso. O cromatograma obtido com a concentração de 20 µg/mL, utilizada para o estudo da precisão, está demonstrado na figura 16. Os resultados das análises intra e inter-dia são apresentados na tabela 8.

**Tabela 8:** Valores experimentais médios obtidos durante o estudo da precisão do método (n=6)

	Amostra Teórica (µg/mL)	Amostra Experimental (µg/mL ± DP)	Recuperação (%)	DPR (%)
<b>Intra-dia</b>				
<b>Dia 1 (n=6)</b>	20,0	19,63 ± 0,05	98,15 ± 0,27	0,27
<b>Dia 2 (n=6)</b>	20,0	19,85 ± 0,03	99,24 ± 0,17	0,17
<b>Dia 3 (n=6)</b>	20,0	19,59 ± 0,05	97,93 ± 0,27	0,27
<b>Inter-dia (n=18)</b>	20,0	19,69 ± 0,14	98,44 ± 0,70	0,72



**Figura 16:** Cromatograma da mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos adicionado de 20  $\mu\text{g}$  de quercetina

A exatidão de um método analítico corresponde à proximidade entre os resultados obtidos por um determinado método e o valor verdadeiro. A exatidão pode ser avaliada através de amostras contendo quantidades conhecidas da substância referência, podendo ser expressa como porcentagem de recuperação (BRASIL, 2003; ICH, 2005). O teste de recuperação foi utilizado para a verificação da exatidão do método proposto, sendo que todos os valores experimentais obtidos encontravam-se dentro dos limites aceitáveis (95-105%) de recuperação (tabela 9), demonstrando assim, que o método é exato.

**Tabela 9:** Valores de recuperação (%) obtidos após adicionar diferentes concentrações de quercetina ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em uma mistura de todos os adjuvantes presentes no ESN e comprimidos (n=3)

Amostra	Amostra de Quercetina		Recuperação (% $\pm$ DP)
	Teórica ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Experimental ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
Comprimidos	15	14,84	98,94 $\pm$ 1,17
	20	19,93	99,66 $\pm$ 0,49
	25	24,82	99,26 $\pm$ 0,16

A metodologia de quantificação de quercetina foi avaliada em relação a sua sensibilidade através da determinação dos limites de detecção e quantificação. O limite de detecção pode ser definido como a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado,



enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração de substância analisada que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRASIL, 2003; ICH, 2005). Neste contexto, a determinação do limite de detecção e quantificação foi calculada com base no desvio padrão da resposta e inclinação da curva de calibração. O limite de detecção e de quantificação foi de 0,10 µg/mL e 0,30 µg/mL, respectivamente.

O conjunto desses resultados obtidos no estudo de validação permite concluir que o método proposto é adequado e seguro para a quantificação do marcador químico – quercetina, no ESN e comprimidos mucoadesivos.

Desta forma, os valores do teor de quercetina nas formulações foram determinados utilizando o método de cromatografia líquida de alta eficiência devidamente validado. Os resultados para as formulações avaliadas estão descritos na tabela 10.

**Tabela 10:** Teor de quercetina nas formulações obtidos por CLAE

<b>Formulações</b>	<b>Teor de quercetina (% ± DP)</b>	<b>Teor de quercetina (mg ± DP)</b>
1	99,10 ± 0,14	1,863 ± 0,003
2	100,17 ± 0,76	1,883 ± 0,014
3	101,20 ± 0,23	1,903 ± 0,004
4	98,53 ± 0,53	1,852 ± 0,010
5	100,62 ± 0,26	1,892 ± 0,005
6	99,72 ± 0,32	1,875 ± 0,006
7	97,52 ± 0,13	1,833 ± 0,002
8	98,52 ± 0,86	1,852 ± 0,016
9	99,23 ± 0,04	1,865 ± 0,001
10	97,47 ± 0,28	1,832 ± 0,005
11	101,67 ± 0,21	1,911 ± 0,004
12	98,52 ± 0,85	1,852 ± 0,016
13	101,25 ± 0,31	1,903 ± 0,006
14	103,99 ± 0,48	1,955 ± 0,009
15	105,08 ± 0,45	1,975 ± 0,008

Conforme os valores especificados na Farmacopéia Brasileira (1988), os comprimidos devem conter, em geral, no mínimo 90% e no máximo 110% da quantidade declarada de ativo. As formulações desenvolvidas apresentam valores entre 97,47 e 105,08 %, estando dentro do limite preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1988).

#### **5.4 Características de intumescimento e erosão dos comprimidos**

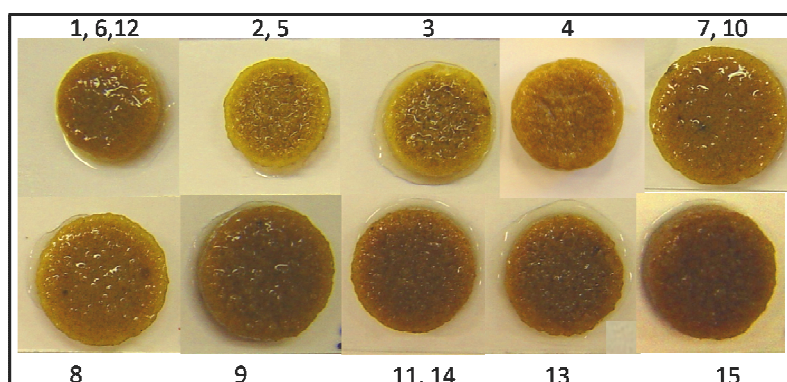
Um comprimido bucal mucoadesivo deve possuir certa resistência aos mecanismos fisiológicos da cavidade oral, como o efeito removedor da saliva e o estresse mecânico (ROSSI; SANDRI; CARAMELLA, 2005; SALAMAT-MÜLLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005). Dentro deste contexto, espera-se que as formulações obtenham um baixo grau de hidratação e uma baixa perda de massa para não se tornarem incômodas na cavidade oral.

Por outro lado, estes fenômenos estão diretamente relacionados com a liberação das substâncias ativas a partir de uma matriz hidrofílica, como é o caso das formulações avaliadas. A matriz hidrofílica pode ser composta por um gel “verdadeiro”, o que ocorre quando o sistema interage na presença de água formando ligações cruzadas, que podem ser ligações químicas ou físicas, e que restringem o movimento das cadeias. Por outro lado, a matriz pode não constituir um gel “verdadeiro”, e é então descrita como uma solução muito viscosa. Em contato com a água, esses sistemas formam uma matriz na qual uma viscosidade maior ocorre em função do simples entrelace de cadeias poliméricas adjacentes, sem que ocorram ligações cruzadas (COLLETT; MORETON, 2005). Após a penetração do meio de dissolução na matriz, ocorre a formação de três diferentes regiões de delimitação (frentes) que separam os diferentes estados termodinâmicos do polímero, ou as várias fases da matriz. Estas são as frentes de intumescimento, difusão e erosão (COLOMBO et al., 2000). A transição do polímero do estado vítreo para o estado elástico ocorre na frente de intumescimento, no núcleo da matriz, enquanto a transição do fármaco do estado sólido ao dissolvido ocorre na frente de difusão. A frente de erosão, por sua vez, corresponde à fronteira entre o meio de dissolução e a superfície da matriz. Durante a liberação do fármaco, as frentes de intumescimento e difusão se movem em direção ao interior da matriz, enquanto a

frente de erosão se move em direção ao exterior (COLOMBO et al., 1995; KONRAD et al., 1998). Desta forma, este estudo pode contribuir para o entendimento do mecanismo de liberação do marcador químico a partir dos comprimidos.

Inicialmente, foi avaliada a influência da composição polimérica das formulações sobre as características de intumescimento das formulações. Como intumescimento entende-se a capacidade de captação de líquido pelo comprimido quando imerso em um meio específico, traduzido pelo aumento de massa em função do tempo. Neste caso, o líquido de imersão utilizado foi saliva artificial e a medida do intumescimento foi realizada por gravimetria. Na figura 17 pode ser visualizada a aparência dos comprimidos depois de submetidos ao intumescimento por 8 horas.

As características de intumescimento estão relacionadas com o próprio polímero e o ambiente envolvente. A interpenetração das cadeias é facilitada quando as cadeias poliméricas estão desenroladas e livres de interações. Por outro lado, a intumescência depende da concentração de polímero e da presença de água, não se pretendendo, no entanto, que esta seja muito elevada, pois nesse caso ocorre uma diminuição da bioadesão (AHUJA et al., 1997).

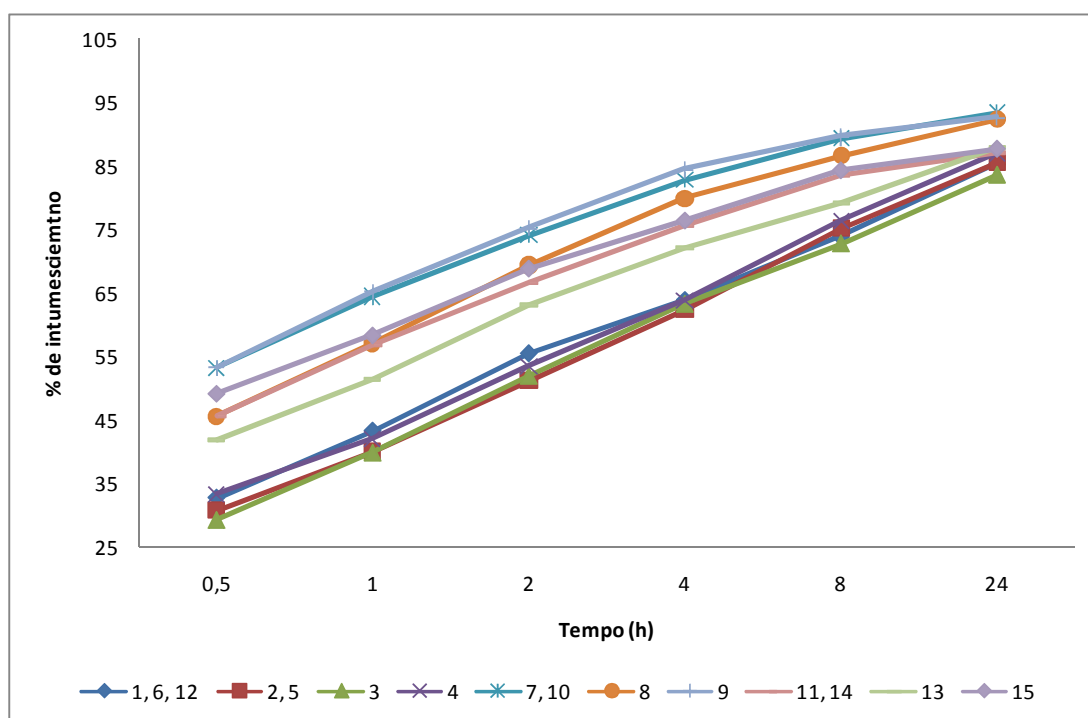


**Figura 17:** Aparência dos comprimidos depois de submetidos ao intumescimento por 8 horas

Mediante a análise dos perfis de intumescimento, demonstrados na figura 18, é possível verificar que todas as formulações captam água em grande quantidade, com um aumento da captação em função do tempo. Porém, a composição polimérica exerce uma influência clara sobre as características de intumescimento dos comprimidos.

Todas as formulações apresentaram um rápido intumescimento inicial de cerca de 40% na primeira hora de ensaio, com a exceção dos comprimidos que contêm quitosana, cujo ganho de peso neste período foi de 50 a 60%. O máximo de intumescimento observado foi de cerca de 90%, também para os comprimidos contendo em suas blendas o polímero quitosana.

Do mesmo modo, verificou-se que todas as matrizes intumescem constantemente do início até o final do ensaio sem a obtenção de platô. Esse resultado é coerente com outros trabalhos recentemente publicados (PERIOLLI, 2004; SRIAMORNSAK et al., 2007), e pode ser visualizado na figura 18.



**Figura 18:** Perfil de Intumescimento das formulações em saliva artificial

A análise estatística (ANOVA) sobre o conjunto dos dados gerados nos experimentos realizados demonstrou que os perfis de intumescência relativos às formulações 1, 2, 3, 4, 5, 6, e 12 não apresentam diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ). Como pode ser observado na figura 18, estas formulações apresentam um menor ganho de peso percentual em todos os tempos estudados. Em comum, estes comprimidos possuem em sua formulação HPMC e/ou CP. Sendo assim, pode-se

inferir que a presença de HPMC e/ou CP, independente da proporção entre eles, não interfere nas características de intumescimento da matriz. De acordo com Mohammadi-Samani (2005), a combinação de polímeros aniônicos com não-iônicos produz um sinergismo aumentando a viscosidade e, conseqüentemente, diminuindo a capacidade de intumescimento, o que poderia explicar o comportamento deste grupo de formulações.

Por outro lado, a presença da quitosana na matriz polimérica, independente da presença dos outros polímeros, induz a um comportamento diferente de intumescimento, evidenciando a influência mais pronunciada desse polímero sobre este parâmetro. Como pode ser visualizado na figura 18, as formulações 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14 e 15 apresentam valores de intumescimento superiores às formulações citadas anteriormente em todos os tempos estudados. No entanto, a análise estatística (ANOVA seguida do teste de Tukey) demonstra diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) decorrentes do tipo de combinação polimérica na matriz e também da proporção entre os polímeros.

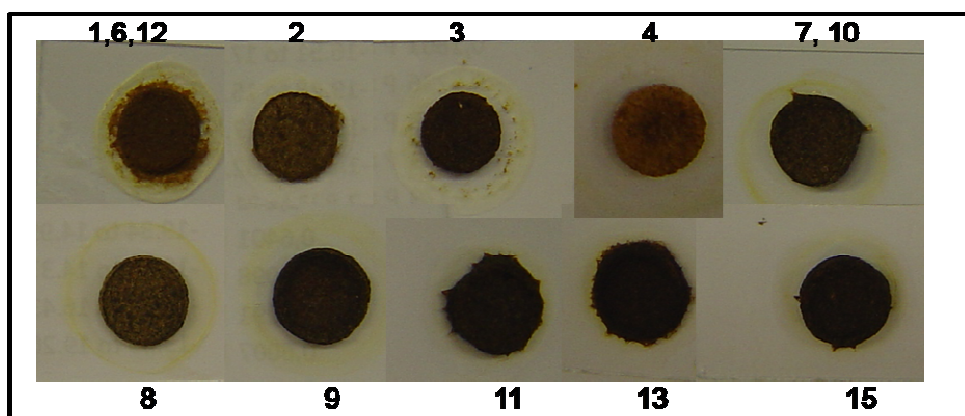
As formulações contendo HPMC e quitosana (formulações 11, 14 e 15), independente da proporção entre elas, apresentam um intumescimento menor do que as formulações correspondentes contendo Carbopol<sup>®</sup> e quitosana (formulações 7, 9 e 10). No entanto, em ambos os grupos, pode ser observada a influência da proporção com a quitosana: não são observadas diferenças significativas de intumescimento (ANOVA  $p > 0,05$ ) nas formulações nas quais a quitosana está presente numa quantidade igual ou superior a de outro polímero (formulações 11, 14 e 15, formulações 7, 9 e 10). Ao contrário, quando a quantidade da quitosana é inferior a do outro polímero da blenda, o intumescimento é menos evidenciado (formulações 8 e 13).

Esses resultados podem ser correlacionados com a hidrofiliidade dos diferentes polímeros. A quitosana possui grupos amina e hidroxila e o Carbopol<sup>®</sup> grupos carboxílicos em sua estrutura molecular, resultando em uma maior capacidade de retenção de água quando comparadas ao HPMC, cuja hidrofiliidade

difere de acordo com o tipo e grau de substituição (PERIOLI et al., 2004; MONAMMADI-SAMANI; BAHRI-NAJAFI; YOUSEFI, 2005; BHISE et al., 2007).

A erosão pode ser descrita como uma liberação contínua do material formador da matriz a partir da superfície do comprimido, isto é, por erosão superficial. A consequência é a redução contínua do peso do comprimido durante o desenrolar do processo de cedência (AULTON, 2005). A velocidade de erosão depende da natureza dos polímeros.

A erosão das matrizes, caracterizada pela perda de massa em função do tempo de imersão do comprimido em um meio específico, foi realizada gravimetricamente, utilizando, como meio, saliva artificial. Na figura 19 pode ser visualizada a aparência dos comprimidos depois de submetidos à erosão por 8 horas.

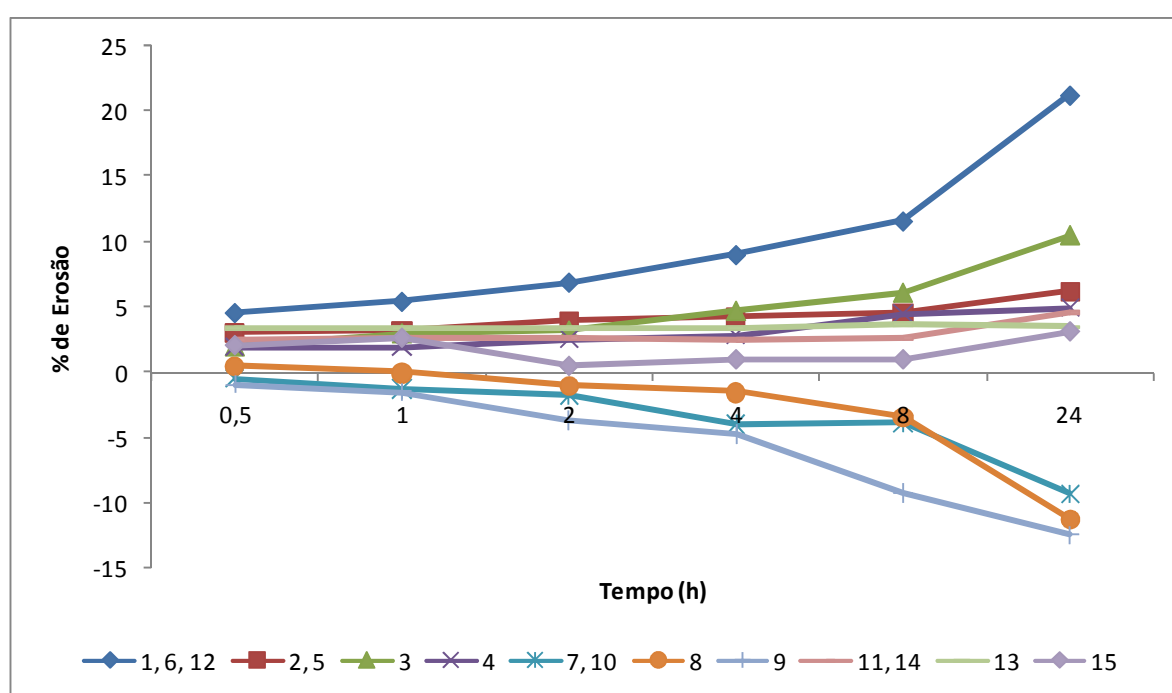


**Figura 19:** Comprimidos após serem submetidos ao ensaio de caracterização da erosão por 8 h

Os polímeros utilizados neste estudo são muito hidrofílicos e podem reter grandes quantidades de água depois da operação de secagem a 60°C. Por esse motivo, em alguns casos, a perda de massa não foi observada e/ou obteve-se valor de erosão negativo. Este efeito foi mais evidente nas blends poliméricas contendo quitosana e Carbopol<sup>®</sup>, formulações (7, 8, 9 e 10), as quais não apresentam diferenças estatísticas (ANOVA,  $p > 0,05$ ), exceto o tempo de 8 horas onde a formulação 9 possui diferença significativa com as demais formulações ( $p < 0,05$ ).

Mediante a análise dos perfis de erosão, demonstrados na figura 20, as formulações que contêm alta concentração de HPMC (formulações 1, 6 e 12) apresentaram maior valor de erosão em todos os tempos estudados.

No entanto, esses valores de erosão não são considerados elevados quando comparados com outros estudos que caracterizam intumescimento e erosão de comprimidos bucais mucoadesivos (TIROSH et al., 1997; PERIOLI et al., 2004; CHIAPPETTA et al., 2006).



**Figura 20:** Perfil de Erosão dos comprimidos em saliva artificial

A análise estatística (ANOVA seguida do teste de Tukey) sobre o conjunto dos dados gerados nos experimentos realizados demonstrou que as formulações 2, 3, 4, 5, 11, 13, 14 e 15 não apresentam diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre elas, exceto as formulações 3 e 15 que são diferentes entre si ( $p < 0,01$ ). Essa diferença pode estar relacionada com a hidrofília desses polímeros, como citado anteriormente. No entanto, podemos enfatizar que diferentes proporções de polímeros não interferem nas características de erosão da matriz, exceto quando HPMC e quitosana estão numa mistura em uma proporção superior ao Carbopol®.

Com esses resultados podemos concluir que o tipo e a quantidade de polímero, se isolado ou em mistura, e as proporções entre os polímeros nas blendas são parâmetros determinantes sobre as características de intumescimento e erosão dos comprimidos. Da mesma forma, foi possível evidenciar que o intumescimento é inversamente proporcional à erosão, assim como a importância da propriedade de hidrofília dos polímeros na caracterização de intumescimento e erosão.

Como respostas do delineamento experimental foram selecionadas o intumescimento e a erosão. Após obter esses resultados, uma faixa de intumescimento (72,77 – 89,92%) e erosão (-9,22 – 12,6%) foi estabelecida. A partir desta informação, o software sugeriu a formulação que teoricamente atenderia a estes parâmetros, ou seja, a blenda polimérica mais adequada para obter estes valores de intumescimento e erosão. Essa formulação otimizada está apresentada no quadro 2.

### 5.5 Caracterização da formulação otimizada

A formulação gerada pelo *software*, com base nas melhores respostas obtidas com relação ao intumescimento e erosão, encontra-se apresentada no quadro 2.

**Quadro 2:** Formulação otimizada proposta pelo *software*

<b>Excipientes</b>	<b>Quantidade dos constituintes (%)</b>
HPMC	13
Carbopol	24,4
Quitossana	1,6
ESN	50
Estearato de Magnésio	1
Carbopol	10

Esta formulação foi caracterizada quanto ao rendimento da operação da granulação, avaliação visual, tamanho, peso médio, dureza, friabilidade e teor de quercetina. Os resultados dessa caracterização podem ser visualizados no quadro 3.

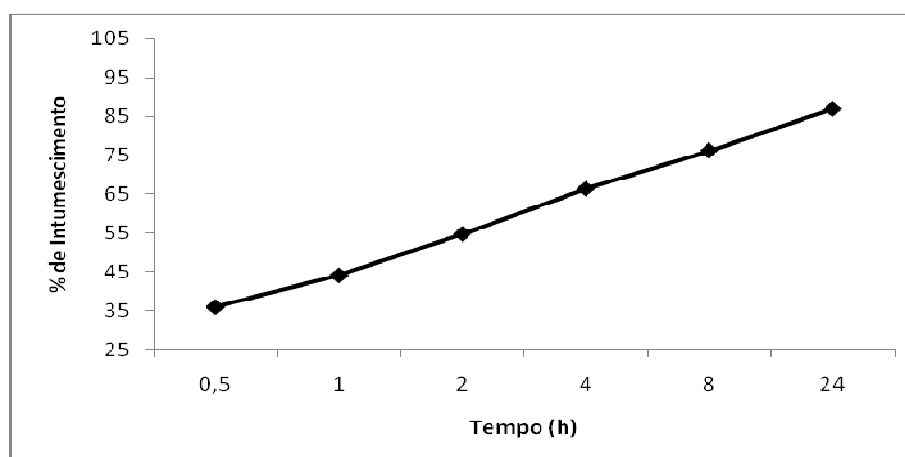


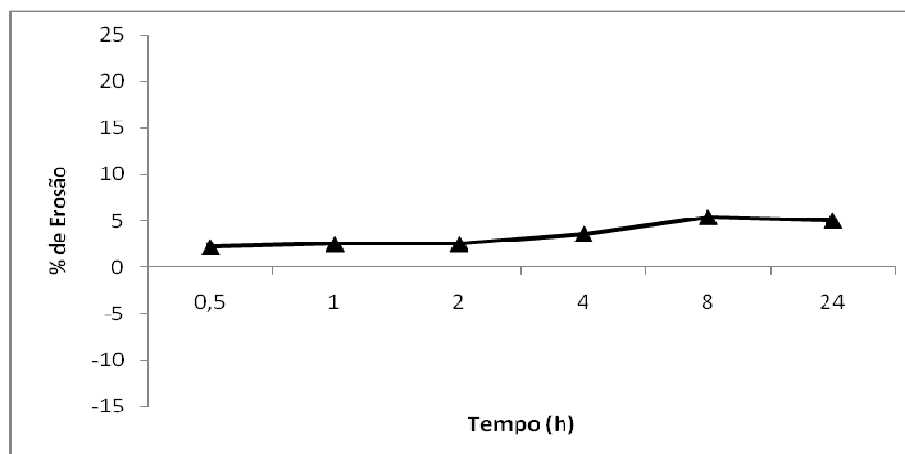
**Quadro 3:** Características da formulação otimizada

Parâmetro analisado	Dados Experimentais
Rendimento da operação da granulação (%)	72,58 %
Avaliação visual	Coloração não homogênea, predominante amarelo pardo, sem rugosidades.
Tamanho (altura e diâmetro) (mm)	2,00 e 10 mm
Peso Médio (mg $\pm$ DP)	200,20 $\pm$ 6,09
Dureza (Kgf $\pm$ DP)	11,74 $\pm$ 1,04
Friabilidade (%)	0,17%
Teor de Quercetina (% $\pm$ DP)	100,56 $\pm$ 0,07

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (1988), a formulação está de acordo com as especificações. Estas podem ser observadas no item Caracterização dos comprimidos (item 5.3.1, página 74).

Ainda, na caracterização do intumescimento e erosão desta formulação, foram previstos pelo *software* valores de intumescimento e erosão por 8 horas de 77,22% e 3,53%. Uma vez que os valores experimentais foram de 76,16% e 5,42%, respectivamente, o delineamento experimental pode ser considerado preciso e robusto. O perfil de intumescimento e erosão da formulação otimizada está demonstrado nas figuras 21 e 22 respectivamente.

**Figura 21:** Perfil de Intumescimento em saliva artificial da formulação otimizada



**Figura 22:** Perfil de Erosão da formulação otimizada em saliva artificial

### 5.6 Tempo de mucoadesão *in vitro*

A avaliação do tempo de mucoadesão tem sido realizada em diversos estudos, uma vez que o tempo de residência da formulação no local de ação pode influenciar diretamente no efeito terapêutico do princípio ativo (EL-SAMALIGY; YAHIA; BASALIOUS, 2004, PERIOLI et al., 2004, IKINCI et al., 2004, CHIAPPETTA et al., 2006).

A mucoadesão é um processo complexo cujo mecanismo ainda não foi perfeitamente elucidado, embora várias teorias tenham sido formuladas. Essas hipóteses incluem interpenetração, molhabilidade, forças eletrostáticas, de adsorção, de difusão e de fratura. Devido a sua complexidade, é provável que o processo de mucoadesão envolva mais de um destes princípios (SMART; 2005; ANDREWS; LAVERTY; JONES, 2008; LYRA et al., 2007).

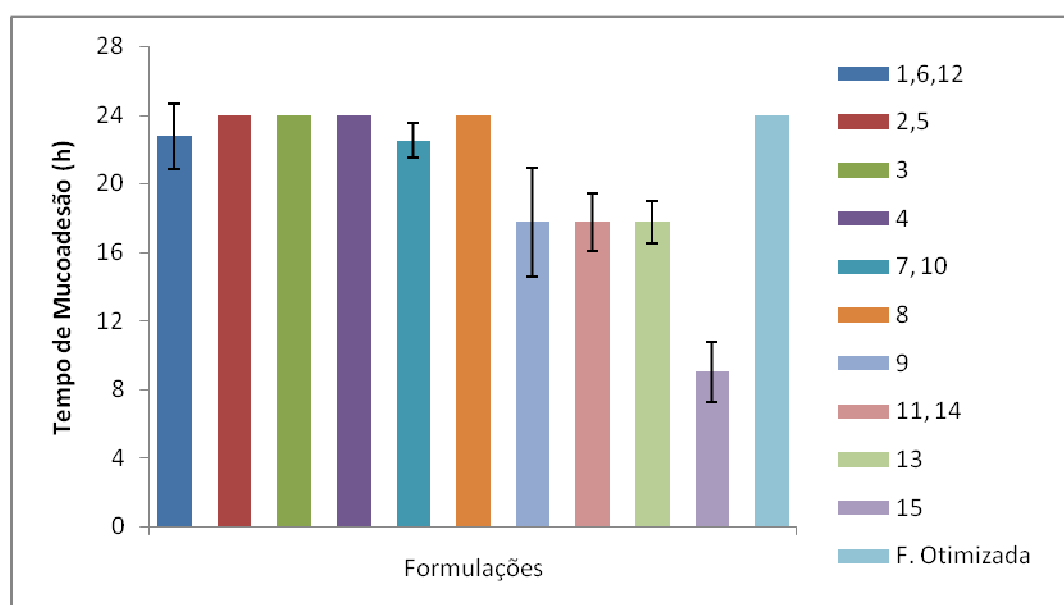
De uma maneira mais simples, a mucoadesão pode ser descrita como um processo que ocorre em duas etapas: etapa 1: contato entre o material mucoadesivo e a mucosa; etapa 2: consolidação através de interações físico-químicas, conduzindo à adesão prolongada (LYRA et al., 2007).

O tempo de mucoadesão das diferentes formulações no esôfago de porco está demonstrado na figura 23, onde é possível verificar que os comprimidos permaneceram aderidos por um tempo superior a 17,75 horas, com exceção da

formulação 15. Esta formulação possui em sua matriz polimérica uma elevada proporção de quitosana (26%) e uma concentração intermediária de HPMC (13%), e apresenta diferença significativa no tempo de mucoadesão (ANOVA  $p < 0,001$ ) quando comparada com as demais formulações avaliadas.

As formulações 1, 6 e 12, réplicas com 39% de HPMC, foram monitoradas até a sua completa desintegração, que foi verificada em um tempo inferior ( $22,75 \text{ h} \pm 1,90$ ) à duração total do ensaio (24 h).

As formulações que permaneceram aderidas na mucosa até o final do ensaio (24 horas), contêm diferentes proporções de Carbopol® (13 – 26 %) (formulações 2, 3, 4, 5, 8) e incluem a formulação otimizada.



**Figura 23:** Tempo de mucoadesão dos comprimidos em contato com o esôfago de porco

Os menores tempos de mucoadesão foram observados com as formulações que contêm quitosana (13 – 26 %) e nenhuma (formulações 11, 13, 14 e 15) ou baixa (13 %, formulação 9) proporção de Carbopol®. Ao contrário, comprimidos que contêm Carbopol® e HPMC originaram formulações com alta mucoadesão (> 24 horas). O maior tempo de mucoadesão das formulações contendo Carbopol® é justificado pela ligação que ocorre entre as cadeias de oligossacarídeos, presentes no muco, e os grupos carboxílicos presentes no Carbopol®, quando comparada com a mucoadesão que ocorre com os grupos amina da quitosana (IKINCI et al., 2006).

Outro fator importante para a mucoadesão é a percentagem de intumescimento das matrizes hidrofílicas. De acordo com Andrews e colaboradores (2008), para que haja mucoadesão é necessário o intumescimento matricial. No entanto, a hidratação não pode ser excessiva, pois neste caso poderá resultar na formação de uma mucilagem escorregadia, diminuindo a capacidade de mucoadesão.

Embora a quitosana possua grupos (aminas e hidroxilas) capazes de formar interações com as glicoproteínas do muco, a sua alta capacidade de reter água ocasionou uma diminuição de mucoadesão.

Por fim, pode ser sugerido que as formulações com maior capacidade de intumescimento (9, 11, 13, 14 e 15) apresentaram um menor tempo de mucoadesão. Estas formulações (com exceção da formulação 15) não apresentam diferenças significativas entre si (ANOVA  $p > 0,05$ ).

A análise estatística (ANOVA seguida do teste de Tukey) sobre o conjunto dos resultados gerados no experimento realizado demonstrou que as formulações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14 e a formulação otimizada não apresentam diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ).

## **5.7 Determinação do perfil de liberação *in vitro***

### **5.7.1 Validação do método de dissolução dos comprimidos**

Para a realização do estudo de dissolução se faz necessária a escolha de uma metodologia analítica capaz de detectar baixas concentrações do fármaco no meio de liberação. Assim, a cromatografia líquida de alta eficiência foi escolhida.

A fim de garantir a confiabilidade dos resultados do estudo de dissolução *in vitro*, alguns parâmetros de validação foram revalidados, conforme descrito abaixo.

#### 5.7.1.1 Avaliação da influência do filtro

A filtração do meio de dissolução antes da quantificação mostra-se necessária para a remoção tanto de partículas não dissolvidas da substância quanto de excipientes insolúveis que podem mascarar resultado ou obstruir a coluna, no caso de serem usados métodos cromatográficos. Para que o filtro possa ser utilizado, os resultados obtidos após a filtração devem estar dentro da faixa de 98 – 102% da concentração inicial da solução não filtrada (MARCOLONGO, 2003; PHARMACOPEIAL FORUM, 2004).

Esta avaliação foi realizada para verificar possíveis alterações significativas na concentração do fármaco para a solução. Com base nos valores mostrados na tabela 11, foi verificado que não houve diferença da concentração da amostra da solução filtrada e da solução não filtrada. Portanto, o filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno 0,45  $\mu\text{m}$  foi selecionado para o desenvolvimento do método de dissolução.

**Tabela 11:** Valores experimentais obtidos na avaliação da influência do filtro

	<b>Amostra</b>	<b>Amostra</b>	<b>Recuperação</b>	<b>DPR</b>
	<b>Teórica (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Experimental</b>	<b>(%)</b>	<b>(%)</b>
		<b>(<math>\mu\text{g/mL} \pm \text{DP}</math>)</b>		
<b>Sem filtração</b>	10	10,08 $\pm$ 0,01	100,81 $\pm$ 0,11	0,11
<b>Com filtração</b>	10	10,03 $\pm$ 0,06	100,26 $\pm$ 0,61	0,61

#### 5.7.1.2 Determinação da solubilidade de quercetina em diferentes meios de dissolução

A solubilidade de um fármaco é parâmetro chave nos estudos de dissolução de formas farmacêuticas. Assim, estabelecer condições *sink* no sistema é de extrema importância.

O termo condições *sink* é definido como não menos que três vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (MARQUES; BROWN, 2002; PHARMACOPEIAL FÓRUM, 2004). Aceita-se também um volume de 5-10 vezes o necessário para saturação seja suficiente para manter as condições

*sink* (ABDOU, 1989). As condições *sink* são desejáveis a fim de evitar que a velocidade de dissolução seja influenciada, artificialmente, pela aproximação da saturação durante a realização do teste, porém, não são obrigatórias (FDA, 1997; MARQUES; BROWN, 2002)

Para manter as condições *sink* no presente estudo, é necessário que a solubilidade da quercetina no meio de dissolução seja igual ou superior a 18,80 µg/mL. As condições *sink* não foram atingidas com água, saliva artificial e saliva artificial acrescida do tensoativo polissorbato 20 na concentração de 0,25% (p/v). No entanto, o aumento da concentração de polissorbato 20 na saliva artificial promovem uma crescente solubilidade de quercetina. Esses resultados podem ser visualizados na tabela 12.

**Tabela 12:** Solubilidade da Quercetina nos meios avaliados, expressa como concentração de saturação

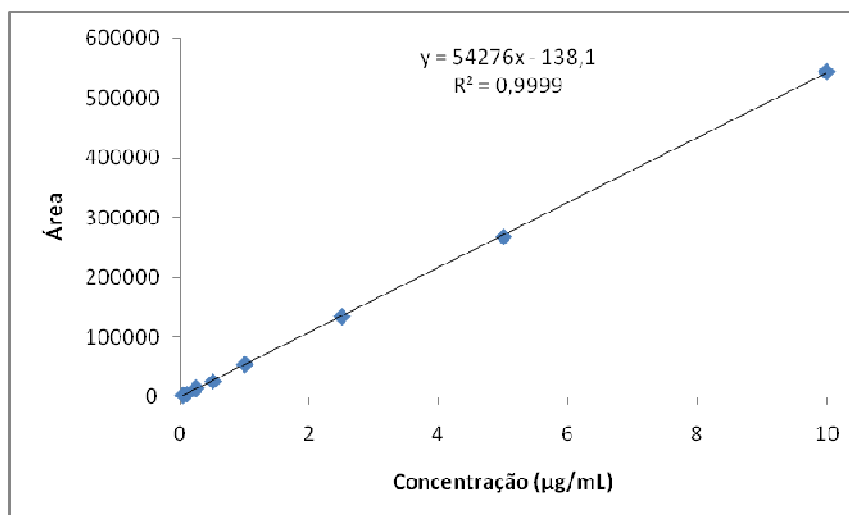
Meio Avaliado	Concentração de Quercetina (µg/mL ± DP)
Água	1,46 ± 0,01
Saliva artificial	0,82 ± 0,02
Saliva artificial + polissorbato 20 (0,25%, p/v)	18,52 ± 0,52
Saliva artificial + polissorbato 20 (0,30%, p/v)	23,15 ± 0,17
Saliva artificial + polissorbato 20 (0,35%, p/v)	26,01 ± 0,41
Saliva artificial + polissorbato 20 (0,40%, p/v)	30,78 ± 0,25
Saliva artificial + polissorbato 20 (0,45%, p/v)	33,09 ± 0,39

Desta forma, os ensaios de dissolução foram realizados utilizando solução saliva acrescida de polissorbato 20 (0,3%, p/v), com a finalidade de garantir condições adequadas para o teste de dissolução para os diferentes comprimidos testados.

#### 5.7.1.3 Linearidade

Dentro da faixa de concentração escolhida (0,05-10,0 µg/mL) o método demonstrou-se linear, nas três curvas construídas, apresentando um coeficiente de

correlação médio de 0,9999. A figura 24 representa a curva de calibração média, bem como a equação da reta obtida por regressão linear utilizada na conversão entre as áreas dos picos dos cromatogramas obtidas e a concentração dos analitos.



**Figura 24:** Curva de calibração média da quercetina obtida por CLAE e sua respectiva equação da reta.

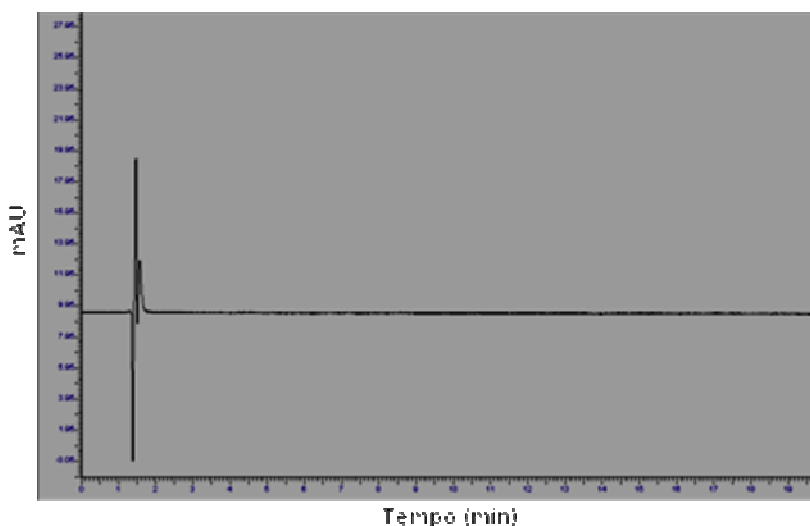
Na tabela 13, estão representados os valores experimentais médios obtidos das áreas absolutas utilizadas para a construção da curva de calibração. A análise do ponto de intersecção e a determinação dos limites de confiança (apêndice B) da curva de calibração demonstram a ausência de erro sistemático constante.

**Tabela 13:** Áreas dos picos médios obtidas após análise das soluções de quercetina por CLAE (n=3)

Faixa de Linearidade (µg/mL)	Área do Pico (Média ± DP)	DPR (%)
0,05	3695 ± 71	1,91
0,10	7419 ± 35	0,47
0,25	13749 ± 70	0,51
0,50	28509 ± 436	1,53
1,0	70757 ± 607	0,86
2,5	138563 ± 916	0,66
5,0	270678 ± 1131	0,42
10,0	476750 ± 4494	0,94

#### 5.7.2.4 Especificidade frente à composição do meio de dissolução

O cromatograma obtido com a análise do meio de dissolução não apresentou interferentes na região de retenção da quercetina, nas condições empregadas, como pode ser verificado pela figura 25. Assim, o método demonstrou-se específico, uma vez que nenhum componente do meio de dissolução interferiu na quantificação do marcador químico.



**Figura 25:** Cromatograma típico obtido por CLAE do meio de dissolução

#### 5.7.1.5 Limite de quantificação e Detecção

O limite de quantificação, calculado através da fórmula preconizada pelo ICH (2005), foi estabelecido com o objetivo de garantir que a faixa de trabalho escolhida está dentro da faixa de concentração quantificável pelo método. Os limite de quantificação e detecção calculados foram de 0,050  $\mu\text{g/mL}$  e 0,017 $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

#### 5.7.2 Determinação do perfil e avaliação da cinética de liberação do marcador químico a partir dos comprimidos

A dissolução/liberação de medicamentos pode ser definida como o fenômeno em que um fármaco no estado sólido libera-se de sua forma farmacêutica de administração e entra em solução. Uma vez solubilizado, o fármaco está pronto para a ação desejada (AMIDON et al., 1995).



Os estudos de dissolução constituem uma ferramenta indispensável nas várias etapas dos processos de desenvolvimento galênico, identificação de variáveis críticas na produção, formulação, controle de qualidade, estabelecimento de correlações *in vitro/in vivo* e assuntos regulamentares (FDA, 1997; MARQUES; BROWN, 2002).

Os métodos de fabricação podem provocar grandes variações no processo de dissolução/liberação. Algumas etapas da fabricação de medicamentos, principalmente no caso de formas farmacêuticas sólidas, como o tempo de mistura, força de compressão e adjuvantes, podem influenciar na dissolução do fármaco a partir de sua forma farmacêutica (PILLAY; FASSIHI, 1998; STORPIRTIS et al., 1999).

Devido às características dessa forma farmacêutica bucal, seu local e forma de aplicação, é essencial que a seleção do aparato, composição do meio, agitação e temperatura sejam levados em considerações durante o delineamento do método para que simule as condições da cavidade bucal.

Diversos trabalhos científicos relatam métodos que podem ser utilizados no estudo de dissolução *in vitro* de formas farmacêuticas bucais. Alguns desses trabalhos foram recentemente revisados por AZARMI; ROA; LÖBENBERG (2007).

No presente estudo, a técnica empregada na determinação do perfil de dissolução do marcador químico foi baseada em alguns exemplos da literatura que empregavam o aparato I, a saliva artificial e o meio de dissolução acrescido de polissorbato 20 (PERIOLI et al., 2004; MOHAMMADI-SAMANI et al., 2005, CASAGRANDE et al., 2007; VARSHOSAZ, DEGHAN, 2002).

O meio de dissolução selecionado para o ensaio foi saliva artificial (descrita no item 4.2.6.1 página 52). Para atingir as condições *sink*, foi necessária a adição do tensoativo polissorbato 20 (0,30% p/v). A escolha desse tensoativo baseou-se no estudo realizado por CASAGRANDE et al. (2007) e VARSHOSAZ, DEGHAN (2002).

A erosão, a difusão e o intumescimento das matrizes são os vários mecanismos pelos quais os sistemas matriciais podem controlar a liberação das substâncias ativas. A predominância de um desses mecanismos depende invariavelmente das propriedades do polímero empregado no sistema. De um modo geral, quando as estruturas matriciais entram em contato com o meio de dissolução, podem manter a sua estrutura mais ou menos constante ao longo de todo o processo de dissolução ou podem sofrer um fenômeno de intumescimento e, posteriormente, de erosão (LOPES, 2005).

A velocidade de liberação do fármaco, no caso de comprimidos matriciais constituídos à base de polímeros hidrofílicos, é condicionada por um ou mais dos seguintes mecanismos cinéticos (RANGA RAO; PADMALATHA, 1988): transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica; intumescimento do polímero com formação de uma camada de gel; difusão do fármaco através da camada de polímero intumescido; erosão do polímero intumescido.

Não apenas a formulação otimizada, mas todos os comprimidos produzidos foram avaliados para fins de comparação. Conforme pode ser observado na figura 26, todos os comprimidos obtiveram baixa liberação do marcador químico nas primeiras horas. Isso pode ser explicado devido à baixa velocidade de penetração da água no sistema matricial, que condiciona o modo de liberação do marcador.

Ainda, a operação de granulação pode ter tido uma influência negativa sobre a liberação do marcador a partir dos sistemas, visto que a densificação do material particulado, resultante do processo, diminui espaços interparticulares e a porosidade, dificultando a penetração do meio líquido (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007).

Um estudo realizado por PETROVICK (2006) demonstrou uma baixa liberação dos flavonóides (quercetina, 3-O-metilquercetina e luteolina) a partir dos granulados contendo ESN de marcela. Em especial a quercetina, que liberou cerca de 16,90 % em 90 minutos, demonstrando que esta baixa liberação dos flavonóides

do ESN também é outro fator limitante para a liberação da quercetina a partir do comprimido.

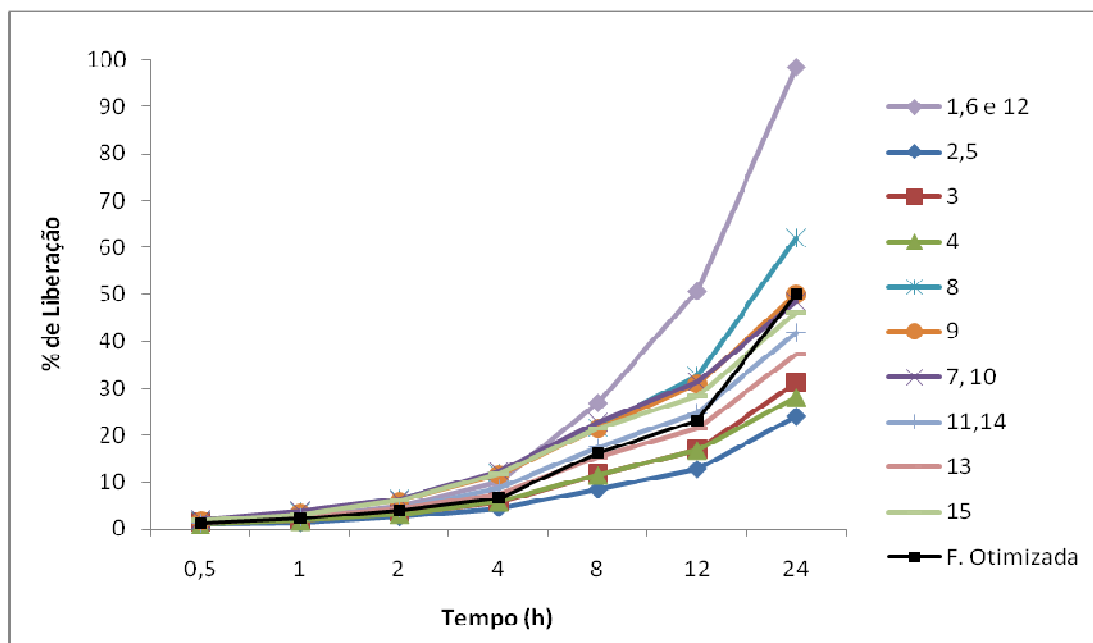
Outro fato bastante relevante é a adição de estearato de magnésio, devido a sua característica hidrofóbica. Assim, pode ser sugerido que a presença desse excipiente agiu de forma inibitória na liberação do marcador químico a partir da forma farmacêutica.

Não foram observadas diferenças significativas entre as formulações 2, 3, 4 e 5, indicando que diferentes proporções de HPMC e CP (13, 19,5% e 26%) não interferem no perfil de liberação. Esse resultado está diretamente correlacionado com as características de intumescimento das matrizes, que mostraram que essas formulações possuem uma baixa capacidade de intumescimento devido a uma maior viscosidade da matriz, dificultando a velocidade de liberação da quercetina.

O HPMC possui capacidade de, após hidratação, intumescer e formar uma camada gelatinosa à superfície do comprimido. Esta funciona como barreira à rápida liberação do fármaco, controlando quer a penetração de água quer a velocidade de liberação da substância ativa (COLOMBO et al., 2000). Quando esse polímero está sozinho (formulações 1, 6 e 12), o perfil de liberação foi controlado, obtendo-se 98,5 % de liberação do marcador químico, pode ser visualizados na figura 26.

As demais formulações (7, 8, 9, 10, 11, 14, 15 e formulação otimizada), não apresentam diferenças significativas entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey). No entanto, a formulação 13 é estatisticamente diferente das formulações contendo Carbopol<sup>®</sup> e quitosana (formulações 7, 8, 9 e 10) e a formulação 8 estatisticamente diferente das formulações que contem HPMC e quitosana (formulações 11, 13 e 14).

A formulação otimizada, conforme pode ser observado na figura 26, apresentou um perfil de liberação intermediário, quando comparado com os obtidos pela maioria das formulações, tendo liberado até 50,19 % em 24 h.



**Figura 26:** Perfil de dissolução do marcador químico nas formulações (DPR < 13,82% no primeiro ponto e DPR < 8,47% nos demais pontos)

Apesar da complexidade dos fenômenos envolvidos na liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais hidrofílicos, alguns modelos bem conhecidos são utilizados extensivamente para analisar a liberação da substância ativa a partir desses sistemas. Assim, na avaliação da cinética de liberação do marcador químico dos comprimidos, os resultados da liberação foram analisados com os modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem e Higuchi.

O tratamento matemático das curvas de dissolução demonstrou que o modelo mais adequado para descrever a cinética de dissolução das diferentes formulações desenvolvidas foi o de primeira ordem, exceto para as formulações 1, 6, 8, 12 e otimizada, cujos dados se ajustaram melhor a uma cinética de ordem zero. Os coeficientes de correlação obtidos estão apresentados na tabela 14. A adequação da maioria das formulações a uma cinética de primeira ordem sugere que a liberação do marcador, nestes sistemas, torna-se dependente da quantidade de flavonóide remanescente na matriz (COSTA; LOBO, 2001, COSTA, 2001; MANADAS; PINA; VEIGA, 2002). Já a partir destas formulações (1, 6, 8, 12 e otimizada) a liberação ocorreria independentemente da quantidade de quercetina remanescente na matriz.

A liberação do marcador químico a partir dos comprimidos bucais mucoadesivos resultou da interação complexa entre a dissolução, a difusão e os mecanismos de erosão. A escolha do tipo de polímero hidrofílico e da quantidade presente na formulação da matriz é essencial para obter combinação adequada dos vários mecanismos (intumescimento, dissolução ou erosão) provavelmente envolvidos na cinética da liberação *in vitro*.

Assim, a utilização de blendas poliméricas constitui uma alternativa no controle de cada um desses processos, uma vez que se pode alterar as características do sistema propiciando o mecanismo desejado de liberação, seja por difusão e/ou erosão.

**Tabela 14:** Valores dos coeficientes de correlação obtidos para os três modelos matemáticos utilizados na linearização das curvas de dissolução

<b>Formulações</b>	<b>Ordem Zero</b>	<b>Primeira Ordem</b>	<b>Higuchi</b>
1	<b>0,9947</b>	0,9480	0,8973
2	0,9973	<b>0,9995</b>	0,9370
3	0,9975	<b>0,9996</b>	0,9372
4	0,9900	<b>0,9968</b>	0,9511
5	0,9992	<b>0,9996</b>	0,9259
6	<b>0,9887</b>	0,9484	0,8547
7	0,9813	<b>0,9988</b>	0,9663
8	<b>0,9989</b>	0,9882	0,9313
9	0,9842	<b>0,9991</b>	0,9618
10	0,9618	<b>0,9877</b>	0,9738
11	0,9878	<b>0,9985</b>	0,9547
12	<b>0,9888</b>	0,9229	0,8877
13	0,9927	<b>0,9993</b>	0,9498
14	0,9906	<b>0,9994</b>	0,9531
15	0,9775	<b>0,9964</b>	0,9699
<b>Form. Otimizada</b>	<b>0,9978</b>	0,9823	0,8977

Perfis de liberação controlados têm sido observados para comprimidos mucoadesivos, em que nem sempre uma liberação total da substância ativa é alcançada pelas formulações, embora esse aspecto seja normalmente almejado nos estudos (PERIOLI et al, 2004; CHIAPPETTA et al., 2006). De fato, conciliar a liberação total da substância ativa com características como baixo intumescimento e erosão, alta mucoadesão e que permitam ao comprimido permanecer de forma conveniente ao paciente no local de aplicação, constitui um dos maiores desafios ao desenvolvimento deste tipo de forma farmacêutica.

No caso dos comprimidos contendo ESN de marcela, em que a quantidade necessária para exercer ação farmacológica contra o vírus do herpes simples não foi ainda estabelecida, a avaliação desses perfis no que se refere à adequabilidade mostra-se como um objetivo a ser ainda alcançado.

Ainda, o monitoramento do perfil de liberação do marcador *in vivo*, na cavidade bucal, poderá ser futuramente avaliado a fim de demonstrar se as condições do ensaio realizado *in vitro* são realmente capazes de reproduzir o ambiente bucal. Uma vez constatada a capacidade do método *in vitro* em prever o comportamento *in vivo*, assim como a necessidade de ocorrer maior liberação do marcador para o efeito farmacológico desejado, uma forma de otimizar o desenvolvimento de uma nova formulação seria empregar novamente o software, inserindo-se as respostas obtidas no ensaio de dissolução, e delinear uma nova composição para a matriz.

## **5 CONCLUSÕES**

---

- O extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides*, apresentou teor de 18,80 mg/g  $\pm$  0,07 de quercetina e baixo teor de umidade (2,47%  $\pm$  0,06);
- Os excipientes de compressão selecionados foram adequadamente identificados por espectroscopia de infravermelho e apresentaram teor de umidade de acordo com as especificações da Farmacopéia Britânica (2007), com exceção do Carpobol<sup>®</sup>, que apresentou um teor de umidade levemente superior ao indicado;
- O estudo das características tecnológicas de formulações obtidas a partir de misturas de ESN com diferentes polímeros ou suas blendas evidenciou que as misturas apresentaram fluxo e compactabilidade inadequadas para serem comprimidas pelo método de compressão direta;
- O método de granulação por via seca proporcionou compressão adequada do material, com boa fluidez e não aderência aos punções da máquina de compressão, bem como permitiu produzir comprimidos com propriedades físicas adequadas;
- A avaliação das propriedades físicas, químicas e físico-químicas dos comprimidos elaborados resultou em formulações com valores que respeitam os critérios farmacopeicos padronizados quanto ao peso médio, dureza, friabilidade e teor de marcador (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988);
- O conjunto dos resultados obtidos no estudo de validação permitiu concluir que o método proposto foi adequado para a quantificação do marcador químico – quercetina, no ESN e comprimidos mucoadesivos;
- A caracterização de intumescimento e erosão *in vitro* dos comprimidos sugere que a quantidade de polímero, se isolado ou em mistura, e as proporções entre os polímeros nas blendas são parâmetros determinantes sobre as características de intumescimento e erosão dos mesmos. Da



mesma forma, foi possível evidenciar que o intumescimento é inversamente proporcional à erosão, assim como as propriedades de hidrofília dos polímeros exercem influência no intumescimento e erosão;

- Os resultados experimentais obtidos na caracterização do intumescimento e erosão da formulação otimizada foram muito semelhantes àqueles obtidos pelo *software*, comprovando a robustez e a capacidade preditiva do delineamento experimental;
- O tempo de mucoadesão da formulação otimizada e demais formulações foi satisfatório e pôde ser relacionado com as características estruturais dos diferentes polímeros;
- O desenvolvimento e a validação do método para avaliar o perfil de liberação *in vitro* da quercetina a partir da formulação otimizada e demais comprimidos desenvolvidos garantiu a confiabilidade dos resultados do estudo de liberação;
- O estudo do perfil, bem como a cinética de liberação *in vitro* da quercetina a partir dos comprimidos, mostrou que todas as formulações apresentaram um prolongamento de liberação do marcador químico, sendo que a formulação otimizada apresentou um perfil de liberação intermediário, que se ajustou ao modelo de ordem zero, com liberação de até 50,19 % de quercetina em 24 h.

## **6 REFERÊNCIAS**

---

- AHUJA A.; KHAR R.; ALI J. Mucoadhesive drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 23, p. 489-515, 1997.
- AKISUE, M. K. Análise do óleo essencial de *Achyrocline satureioides* DC. Compositae. *Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo*, v. 9, p. 107-114, 1971.
- ALDERBORN, G.; Comprimidos e compressão In: AUTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed., Artmed: São Paulo, 2005. Cap. 27, p. 403 – 443.
- ALLEN, L. V. J.; POPOVICH, N. G., ANSEL, H. C. *Formas Farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 8 ed, Artmed: Porto Alegre, 2007.
- AMEYE, D., VOORSPOELS, J., FOREMAN, P., TSAI, J., GERESH, S., REMON, J. P. Ex vivo bioadhesion and in vivo testosterone bioavailability study of different bioadhesive formulations based on starch-g-poly(acrylic acid) copolymers and starch/poly(acrylic acid) mixtures. *Journal of Controlled Release*, v. 79, p. 173-182, 2002.
- AMIDON, G. L.; LENNERNAS, H.; SHAH, V. P.; CRISON, J. R. A.; A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of *in vitro* drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. *Pharmaceutical Research*, v. 12, n. 3, p. 413-420, 1995.
- ANDREW, G. P., LAVERTY, T. P., JONES, D. S. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (2008), doi: ,10.1016/j.ejpb.2008.09.028
- ARREDONDO, M. F., BLASINA, F., ECHEVERRY, C., MORQUIO, A., FERREIRA, M., ABIN-CARRIQUIRY, M. F., LAFON, L., DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of Ethnopharmacology*. V. 91, p. 13-20, 2004.
- ARTURSSON, P., LINDMARCK, T., DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharmaceutical Research*, v. 11, p. 358-361, 1994.
- AUGSBURGER, L. L., VUPPALA, M. K. Theory of granulation. In: PARIKH, D. M. *The handbook of Pharmaceutical Granulation Technology*. New York: Marcel Dekker, 1997.
- AUTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed., Artmed: Porto Alegre, 2005.
- AZARMI, S., ROA, W., RAIMAR, L. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *Internatinal Journal of Pharmaceutics*, v. 328, p. 12-21, 2007.
- BARBOSA, L. C. A. *Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos*. UFV: VIÇOSA, 2007.

- BASSANI, V. L. Valorisation de formes galéniques végétales. Desalcoolisation et concentration de solutions extratives sur membrane d'osmose inverse. Tese (Doutorado em Farmácia) - Faculté de Pharmacie, Université de Montpellier, 1990.
- BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F.; ORTEGA, G. G.; LEMOS SENNA, E.; SIMÕES, C. M. O.; SONAGLIO, D.; PETROVICK, P. R. Processo para obtenção de extratos de *Achyrocline satureioides* e produto obtido. INPI. BR n. PI 103468-5, 12 de julho 2001.
- BETTEGA, J. M. R.; TEIXEIRA, H.; BASSANI, V. L.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Evaluations of the antiherpestic activity of standardized extracts of *Achyrocline satureioides*. *Phytotherapy Research*, v. 18, p. 819-823, 2004.
- BHISE, K. S.; DHUMAL, R. S.; CHAUHAN, B.; PARADKAR, A.; KADAM, S. S. Effect of oppositely charged polymer and dissolution medium on swelling erosion, and drug release from chitosan matrices. *AAPS PharmSchiTech*, v.8, n. 2, 2007.
- BIOALLIANCE PHARMA. Disponível em: <<http://www.bioalliancepharma.com/>> Acesso em e 05 de Janeiro de 2009.
- BOHLMANN, F.; BURKHARDT, T.; ZDERO, C. Naturally Occurring Acetylenes. Academic Press: London, 1973.
- BOLTON, S. *Pharmaceutical Statistics: Pratical and Clinical Applications*. New York: Marcel Dekker, 1984.
- BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I., Treatment of Herpes simples virus infections, *Antiviral Research*, v. 61, p. 73-81, 2004.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 899, de 29 maio 2003. *Diário Oficial da União*, 02 junho 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 48, de 16.mar.2004. *Diário Oficial da União*, 18.mar.2004.
- BRITISH PHARMACOPOEIA, The Stationery Office: London, 2007.
- BROUSSALIS A. M.; FERRARO, G. E.; GURNI, A.; COUSSIO, J. D. Phenolic constituents of four *Achyrocline* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 16, p. 401-402, 1988.
- CAFAGGI, S.; LEARDI, R.; PARODI, B.; GAVIGLIOLI, G.; RUSSO, E.; BIGNARDI, G. Preparation and evaluation of a chitosan salt-ploxame 407 based matrix for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v.102, p. 159 – 169, 2005.
- CALVO, D.; CARIDDI, L. N.; GROSSO, M., DEMO, M. S.; MALDONADO, A. M. *Achyrocline satureioides* (LAM.) DC (Marcela): antimicrobial activity on *Staphylococcus* spp. And immunomodulating effects on human lymphocytes. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. v. 48 (3-4), p. 247-255, 2006.

- CARNEY, J. R.; KRENISKY, J. M.; WILLIAMSON, R. T.; LUO, J. Achyrofunanm a new antihyperglycemic dibenzofuran from the south American medicinal plant *Achyrocline satureioides*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 203-205, 2002.
- CARR, R. T. Evaluating flow properties of solids. *Chemical Engineering*, v. 18, 1965.
- CASAGRANDE, R., GEORGETTI, S. R., VERRI, W. A., BORIN, M. F., LOPEZ, R. F. V., FONSECA, M. J. V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. *International Journal of Pharmaceutics*, v.328, p. 183-190, 2007.
- CECIL, R. L.; GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. *Tratado de medicina interna*. 22. ed. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2005. 2v.
- CHIAPPETTA, A. D.; GERGIC, P. E; LEGAPSI, J. M.; CANTARELLI, N. G.; GAMBOA, G. F. N.; BREGNI, C. Comprimidos Bioadhesivos formulados con excipientes hidrofílicos para uso bucofaringeo. *Acta Farmaceutica Bonaerens*, v. 25 (3), p. 360 – 365, 2006.
- COLLETT, J; MORETON, C. Formas farmacêuticas perorais de liberação modificada. In: AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap.20, p.299-313.
- COLOMBO, P.; BETTINI, R.; MASSIMO, G.; CATELLANI, P. L.; SANTI, P.; PEPPAS, N. A. Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 84 n. 8, p. 991-997, 1995.
- COLOMBO, P.; BETTINI, R.; SANTI, P.; PEPPAS, N. A. Swellable matrices for controlled drug delivery: gel-layer behaviour, mechanisms and optimal performance. *Pharmaceutical Science e Technology Today*. v.3, n. 6, p. 198-204, 2000.
- COSENTINO, M.; BOMBELLI, R.; CARCANO, E.; LUINI, A.; MARINO, F.; CREMA, F.; DAJAS, F.; LECCHINI, S. Immunomodulatory properties of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. infusion: A study on human leukocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 501-507, 2008.
- COSTA, An alternative method to the evaluation of similarity factor in dissolution testing. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 220, p. 77-83, 2001.
- COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 13, p. 123-133, 2001
- COUTO, A. G.; ORTEGA, G. G; PETROVICK, P. R. Granulação. *Caderno de Farmácia*, v. 16, n. 1, p. 13 – 20, 2000.
- CURY, B. S. F.; SILVA, N. P. J.; CASTRO, A. D. Influência das propriedades de granulados de celulose nas características físicas dos comprimidos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. V. 29., p. 37-44, 2008.

DA SILVA, D. M. *Desenvolvimento de forma farmacêutica semi-sólida contendo extrato padronizado de Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. Asteracea*. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

DE FARIA, J. L. *Patologia especial: com aplicações clínicas*. 2. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 687 p.

DE PAULA, I. C.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. Development of ointment formulations prepared with *Achyrocline satureioides* spray-dried extracts. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 24, n. 3, p. 235-241, 1998.

DE SOUZA, K. C. B.; SACHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. LC determination of flavonoids: separation of quercetin, luteolin and 3-O-methylquercetin in *Achyrocline satureioides* preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 28, n. 3-4, p. 771-777, 2002.

DE SOUZA, K. C. B., BASSANI, V. L., SCHAPOVAL, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine*, v. 14, p. 102-108, 2007.

DEGIM, T.; EGLIN, B.; OCAK, Ö. A sustained release dosage form of acyclovir for buccal application: An experimental study in dogs. *Journal of Drug Targeting*, v. 14, n. 1, p. 35-44, 2006.

DHAWAN, S., SINGLA, A. K., SINHA, V. R. Evaluation of Mucoadhesive Properties of Chitosan Microspheres Prepared by Different Methods. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 5(4), artigo 67, 2004.

DREW, W. L., Vírus Herpes, In: WILSON, W. R., SNADE, M. A. *Doenças Infecciosas Diagnósticos e tratamento*. Porto Alegre: Editora Artmed, 2004. Cap 33.

DUCHÊNE, D.; PONCHEL, G. Bioadhesion of solid oral dosage forms. Why and how? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 44, p. 15-23, 1997.

ELL-SAMALIGY, M. S., YAHIA, S. A., BASALIOUS, E. B. Formulation and evaluation of diclofenac sodium buccoadhesive discs. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 286, p. 27-39, 2004.

FARMACOPÉIA Brasileira, 1<sup>o</sup> ed. São Paulo: Nacional, 1928.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARMACOPÉIA Brasileira, 4<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

FDA- *Food and Drug Administration: Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms*. p. 1-11. Agosto, 1997.

FERRARO, G. E., NORBEDO, C., COUSSIO, J. D. Polyphenols from *Achyrocline satureioides*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 8, p. 2053-2054, 1981.

GIANNOLA, L. I., DE CARO, V., GIANDALIA, G., SIRAGUSA, M. G., TRIPODO, C., FLORENA, A. M., CAMPISI, G. Release of naltrexone on buccal mucosa: Permeation studies, histological aspects and matrix system design. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 71, p. 425-433, 2007.

GOMATHI, K., GOPINATH, D., AHMED, M. R., JAYAKUMAR, R. Quercetin incorporated collagen matrices for dermal wound healing processes in rat. *Biomaterials*, v. 24, p. 2767-2772, 2003.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited *in vitro* by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureioides*. *Life Sciences*, v. 71, p. 693-705, 2002a.

GUTERRES, S. S. *Influência de adjuvantes sobre as características farmacêuticas de cápsulas de gelatina dura contendo hidroclorotiazida*. Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Farmácia da UFRGS, 1990. 118f. Dissertação (Mestrado em Farmácia).

GUYOT, J. C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J. P.; CHULIA, D.; DUCHENE, D.; FERRAND, D.; GOUAHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MALFROID, F.; POURCELOT Y.; RENOUX, R.; SERGOT, S.; TORE, P. Commentaires relatives aux methods generals d'analyses des forms orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. *S. T. P. Pharma Pratiques*, v. 5, n. 6, p. 482-494, 1995.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARRIS, D.; ROBINSON, J. R. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 81, p. 1-10, 1992.

HERGET, G. W.; RIEDE, U. N.; SCHMITT-GRÄFF, A.; LUBBERT, M.; NEUMANN-HAEFELIN, D.; KÖHLER, G. Generalized herpes simplex vírus infection in an immunocompromised patient – report of a case and review of the literature, *Pathology-Research and Practice*, v. 201, p. 123-129, 2005.

HNATYSZYN, O.; MOSCATELLI, V.; RONDINA, R.; COSTA, M.; ARRANZ, C.; BALASZCZUK, A.; COUSSIO, J.; FERRARO, G. Flavonoids from *Achyrocline satureioides* with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine*, v. 11, p. 366-369, 2004.

HOLZSCHUH, M. H.; SILVA, D. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L. Thermal and photo stability of phenolic constituents in spray-dried powder from *Achyrocline satureioides* (Lam.) D. C. *Pharmazie*, v. 62, n. 12, p. 902-906, 2007.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: *Q2(R1)-Validation of Analytical procedures: methodology* 2005.

- IKINCI, G., SENEL, S., WILSON, C. G.; SUMNU, M. Development of a buccal bioadhesive nicotine tablet formulation for smoking cessation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 227, p. 173-178, 2004.
- IKINCI, G., SENEL, S., TOKGOZOGLU, L., WILSON, C. G.; SUMNU, M. Development and *in vitro/in vivo* evaluations of bioadhesive buccal tablets for nicotine replacement therapy. *Pharmazie*, v. 61, p. 203-207, 2006.
- ILLUM, L. Chitosan and Its Use as a Pharmaceutical Excipient. *Pharmaceutical Research*, v. 15(9), 1998.
- JIVRAJ, I. I.; MARTINI, L. G.; THOMSON, C. M. An overview of the different excipients useful for the direct compression of tablets. *Pharmaceutical Science e Technology Today*, v. 3 (2), p. 58 – 63, 2000.
- KADARIAN, C.; BROUSSALIS, A. M.; MINO, J.; LOPEZ, P.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G.; ACEVEDO, C. Hepatoprotective activity of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. *Pharmacological Research*, v. 45, p. 57-61, 2002.
- KARASULU, H. Y.; HILMIOGLU, S.; METIN, D.; GUNERI, T. Efficacy of a new ketoconazole bioadhesive vaginal tablet on *Candida albicans*. *IL Farmaco*, v. 59, p. 163-167, 2004.
- KEEGAN, G.; SMART, J.; INFRAM, M.; BARNES, L.; REES, G.; BURNETT, G. An *in vitro* assessment of bioadhesive zinc/carbomer complexes for antimicrobial therapy within the oral cavity. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 340, p. 92 – 96, 2007.
- KIBBE, A. H. (Ed.). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 3. ed. London: Pharmaceutical, 2000.
- KNORST, M.T. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (L.A.) D.C. Compositae (marcela). Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1991. 228f. Dissertação (Mestrado em Farmácia).
- KOCKISCH, S., REES, G. D., YOUNG, S. A., TSIBOUKLIS, J., SMART, J. D. A direct-staining method to evaluate the mucoadhesion of polymers from aqueous dispersion. *Journal of Controlled Release*, v. 77, p. 1-6, 2001.
- KONRAD, R.; CHRIST, A.; ZESSIN, G.; COBET, U. The use of ultrasound and penetrometer to characterize the advancement of swelling and eroding fronts in HPMC matrices. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 163, p. 123-131, 1998.
- LACHMANN, L.; LIBERMAN, H. A.; KANING, J. L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. 1 ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v. II, p. 551-578.
- LAMATY, G.; BÈSSIÈRE, J. M.; SCHENKEL, E. P.; SANTOS, M.; BASSANI, V. L. The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. *Brazilian Journal of Essential Oil Research*, v.3, p. 317-332, 1991.



- LEMOS-SENNA, E.; PETROVICK, P. R.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L. Preparation and characterization of Spray-dried powdered form *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. extracts. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 123 - 127, 1997.
- LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.
- LYRA, M. A. M.; SOARES SOBRINHO, J. L.; BRASILEIRO, M. T.; LA ROCA, M. F.; BARRAZA, J. A.; VIANA, O.; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos. *Latin American Journal of Pharmacy*. v. 26, n. 5., p. 784-793, 2007.
- MAKHLOF, A., WERLE, M., TAKEUCHI, H. Mucoadhesive drug carriers and polymers for effective drug delivery. *J. Drug Del. Sci. Tech.* V. 18, n.6, p. 375 – 386, 2008.
- MANADAS, R., PINA, M. E., VEIGA, F. A dissolução *in vitro* na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 38, n. 4, p. 375-399, 2002.
- MARCOLONGO, R. Dissolução de medicamentos: fundamentos, aplicações, aspectos regulatórios e perspectivas na área farmacêutica. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2003. 117f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos).
- MARQUES, M. R. C.; BROWN, W. Desenvolvimento e validação de métodos de dissolução para formas farmacêuticas sólidas. *Revista Analytica*, n. 1, p. 48-51, 2002.
- MCCORMACK, D.; WALSH, J. C.; BARTON, S.; KIFFER, C. R. V. Herpes Simples, In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. *Tratado de infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996. Cap 25.
- MESQUITA, A. A. L.; CORREA, D. B.; PADUA, A. P.; GUEDES, M. L. O., GOTTLIEB, O. R. Flavonoids from four Compositae species. *Phytochemistry*, v.25, p. 1255-1256, 1986.
- MIZRAHI B.; DOMB A. J. Mucoadhesive polymers for delivery of drugs to the oral cavity. *Recent Patents on Drug Delivery e Formulation*, v. 2, n. 2, p. 108-119, 2008.
- MOHAMMADI-SAMANI, S., BAHRI-NAJAFI, R., YOUSEFI, G. Formulation and *in vitro* evaluation of prednisolone buccoadhesive tablets. *IL Farmaco*, v. 60, p. 339-344, 2005.
- MORQUIO, A.; RIVERA-MEGRET, R.; DAJAS, F. Photoprotection by Topical Application of *Achyrocline satureioides* (marcela). *Phytotherapy Research*, v. 19, p. 486-490, 2005.
- MORTAZAVI, S. An *in vitro* assessment of mucus/mucoadhesive interactions. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 124, p. 173-182, 1995.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to Spectroscopy – a guide for students of organic chemistry*. 2. ed. Philadelphia: Saunders College, 2001.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; ANGELICI, F.; RICCI, M.; GIOVAGNOLI, S.; CAPUCCELLA, M.; ROSSI, C. Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. *Journal of Controlled Release*, v. 99, p.73 – 82, 2004.

PERIOLI, L.; AMBROGI, V.; RUBINI, D.; GIOVAGNOLI, S.; RICCI, M.; BLASI, P.; ROSSI, C. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. *Journal of Controlled Release*, v. 95, p. 521-533, 2004.

PETROVICK P. R.; ORTEGA, G.; BASSANI, V. L. From a medicinal plant to a pharmaceutical dosage form. A (still) long way for the Brazilian medicinal plants. *Journal of the Brazilian Association Advancement Science*, v. 49, p. 364-369, 1997.

PETROVICK, G. F. Desenvolvimento e avaliação tecnológica de granulado revestido contendo produto seco por *spray drying* de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Asteraceae (marcela). 2006, Dissertação (mestrado em Ciência Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, UFRGS. Porto Alegre.

PETROVICK, P. R., KNORST, M. T. Characterization of a Concentrated Extract of *Achyrocline satureioides* as an Intermediary Product in the Preparation of an Ointment. *Phytotherapy Research*, v. 5, p. 237-238, 1991.

PHARMACOPEIAL FORUM. *Pharmacopeial Previews*, v. 30 n. 1, p. 351-363, 2004.

PICKER-FREYER, K. M.; BRINK, D. Evaluation of powder and tableting properties of chitosan. *AAPS PharmaSciTech*, v. 7, n. 75, 2006 .

PILLAY, V., FASSIHI, R. In vitro release modulation from cross-linked pellets for site-specific drug delivery to the gastrointestinal tract. Part 1. Comparison of pH-responsive drug release and associated Kinetics. *Journal Controlled Release*, v. 59, p. 229-242, 1999.

POLYDORO, M.; DE SOUZA, K. C. B.; ANDRADES, M. E.; DA SILVA, E. G.; BONATTO, F.; HEYDRICH, J.; DAL PIZZOL, F.; SCHAPOVAL, E. E. S.; BASSANI, V. L.; MOREIRA, J. C. F. Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of *Achyrocline satureioides* extracts. *Life Sciences*, v. 74, p. 2815-2826, 2004.

PRISTA, N. L.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. *Tecnologia Farmacêutica*. 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

RANGA RAO, K. V., PADMALATHA, D. K. Swelling controlled release systems: recent developments and applications. *Industrial Journal Pharmacy*, v. 48, p. 1-13, 1988.

ROSSI, S.; SANDRI, G.; CAMELLA, C. M. Buccal drug delivery: A challenge already won? *Drug Discovery Today: Technologies*, v. 2, n. 1, p. 59-65, 2005.

RUFFA, M. J.; WAGNER, M. L.; SURIANO, M.; VICENTE, C.; NADINIC, J.; PAMPURO, S.; SALOMÓN, H.; CAMPOS, R. H.; CAVALLARO, L. Inhibitory effect of

medicinal herbs against RNA and DNA viruses. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, v. 15, p. 153-159, 2004.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T. P. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 1666- 1691, 2005.

SANTOS, A. L. G.; RIPOLL, D.; NARDI, N.; BASSANI, L. V. Immunomodulatory Effect of *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Aqueous Extracts. *Phytotherapy Research*, v. 13, p. 65-66, 1999.

SENEL, S., CAPAN, Y., SARGON, M. F., GIRAY, C. B., HINCAL, A. A. Histological and bioadhesion studies on buccal bioadhesive tablets containing a penetration enhancer sodium glycodeoxycholate. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 170, p. 239-245, 1998.

SENEL, S., HINCAL, A. A. Drug permeation enhancement via buccal route: possibilities and limitations. *Journal of Controlled Release*, v. 72, p. 133-144, 2001.

SIMÕES, C. M. O, 1984. Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela). Dissertação – Mestrado em Farmácia, Curso de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Porto Alegre.

SIMÕES, C. M. O. ; RECH, N.; LAPA, A. J. Investigação Farmacológica de extrato aquoso de folhas/caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Compositae (Marcela). *Caderno de Farmácia*, v.2, n.1, p.28-36, 1986.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKE, E. P.; BAUER, L.; LANGELOH, A. Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Compositae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 22, p. 281 – 293, 1988a.

SIMÕES, C. M. O. Antiinflammatory action of *Achyrocline satureioides* extracts applied topically. *Fitoterapia*, v. 59, n. 5, p. 419-422, 1988b.

SMART, J. D. The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 57, n. 11, p. 1556-1568, 2005.

SOARES, L. A. L.; PETROVICK, P. R. Física da compressão. *Caderno de Farmácia*, Porto Alegre, v. 15, n. 2, p. 65 – 79, 1999.

SOARES, L. A. L. Obtenção de comprimidos contendo alo teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

SOARES, L. A. L.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; SCHMIDT, P. C. Dry granulation and compression of spray-dried plant extracts. *AAPS PharmSciTech*, v. 6, n. 3, artigo 45, 2005.

SONAGLIO, D. Padronização de extrato hidroetanólico das sumidades floridas de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C. Compositae (Marcela). 1987. 163p. Dissertação (Mestrado de Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

SOUSA, J. A.; MIRANDA, E. M. *Plantas medicinais e fitoterápicos: Alternativas*. Disponível em: <<http://www.cpafac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/planmed.htm>> Acesso em 05 de Janeiro de 2009.

SRIAMORNSAK, P.; THIRAWONG, N.; WEERAPOL, Y.; NUNTHANID, J.; SUNGTHONGJEEN, S. Swelling and erosion of pectin matrix tablets and their impact on drug release behavior. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 67, p. 211-219, 2007.

STANIFORTH, J. N. Fluxo de pós. In: AULTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.208-221

STORPIRTIS, S., OLIVEIRA, P. G., RODRÍGUEZ, D. MARANHO, D. Considerações biofarmacotécnicas relevantes na fabricação de medicamentos genéricos: fatores que afetam a dissolução e a absorção de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.35, n.1, p.1-16, 1999.

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

SUMMERS, M.; AUTON, M. E. Granulação. In: AUTON, M. E. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2 ed., Porto Alegre: Artmed, 2005.

TEXEIRA, H. F. Avaliação da influência de adjuvantes farmacêuticos sobre características físicas, químicas, tecnológicas e farmacológicas de extratos secos nebulizados de *Achyrocline satureioides* (Lam.) D.C., Asteraceae (Marcela). 1996. 146p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre.

THOMAS, C., POURCELOT, Y. Preformulation of five commercial celluloses in drug development: reological and mechanical behavior. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 19, n. 15, p. 1947-1964, 1991.

TIROSH, B.; BALUOM, M., NASSAR, T., FRIEDMAN, M. The effect of Eudragit RL-100 on the mechanical and mucoadhesion properties of polycarbophil dosage forms. *Journal of Controlled Release*, v. 45, p. 57-64, 1997.

VARSHOSAZ, J., DEGHAN, Z. Development and characterization of buccoadhesive nifedipine tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 54, p. 135-141, 2002.

VIRIDÉN. A.; WITTGREN, B.; LARSSON, A. Investigation of critical polymer properties for polymer release and swelling of HPMC matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutica Sciences*. V. 36, p. 297-309, 2009.

WATSON, D. G. *Pharmaceutical Analysis: a textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists*. London: Churchill Livingstone, 2005.

WEKEMA, M. C. C. Planejamento e análise de experimentos: como identificar e avaliar as principais variáveis influentes em um processo. Belo Horizonte: Fundação Christiano Ottoni, 1996.

WELLS, J. I. *Pharmaceutical Preformulation: the Physicochemical Properties of Drug Substances*. London: Ellis Horwoode, 1988.

WELLS, J. Pré-formulação farmacêutica. In: AULTON, M. *Delineamento de formas farmacêuticas*. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.125-148

WEYENBERG, W.; BOZDAG, S.; FOREMAN, P., REMON, J. P.; LUDWIG A. Characterization and in vivo evaluation of ocular minitablets prepared with different bioadhesive Carbopol-starch components. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 62, p. 202-209, 2006.

WILHELM FILHO, D. ; DA SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 2001. p. 318-334.

WU, B.; CHEN, Z.; WEI, X.; SUN, N.; LU, YI.; WU, W. Biphasic release of indomethacin from HPMC/pectin/calcium matrix tablet: I Characterization and mechanistic study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. v. 67, p. 707-714, 2007.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Rev. Ampl., Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003. Cap. 23, p. 577-614.

## **7 APÊNDICES**

---

APÊNDICE A – Análise do ponto de intersecção e determinação dos limites de confiança da curva de calibração de quercetina por CLAE para o doseamento do marcador químico nos comprimidos.

Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração de quercetina por CLAE

<b>Parâmetros de regressão</b>	<b>Valores</b>
Intercepto (intervalo de confiança)	34867,67 (-2731,18 a 72466,52)
Inclinação (intervalo de confiança)	70436,08 (68663,65 a 72208,50)
$R^2$	0,9998

APÊNDICE B – Análise do ponto de intersecção e determinação dos limites de confiança da curva de calibração de quercetina por CLAE para a determinação do perfil de liberação *in vitro* do marcador químico

Análise dos dados de regressão obtidos a partir da curva de calibração de quercetina por CLAE

<b>Parâmetros de regressão</b>	<b>Valores</b>
Intercepto (intervalo de confiança)	-138,15 (-1590,29 a 1313,99)
Inclinação (intervalo de confiança)	54275,86 (53919,14 a 54632,57)
$R^2$	0,9999



APÊNDICE C – Valores médios individuais de intumescimento (%) das diferentes formulações em saliva artificial

Valores de intumescimento (%) das diferentes formulações

Form.	Tempos ( % ± DP )					
	0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
<b>1</b>	33,00 ± 1,05	43,23 ± 0,13	55,04 ± 0,24	64,28 ± 0,94	73,57 ± 0,46	84,52 ± 1,73
<b>2</b>	30,54 ± 0,80	40,93 ± 1,16	52,25 ± 0,87	63,10 ± 1,21	75,57 ± 0,55	85,34 ± 0,32
<b>3</b>	29,29 ± 1,05	39,87 ± 1,30	51,96 ± 1,06	63,26 ± 2,32	72,77 ± 0,62	83,57 ± 1,53
<b>4</b>	33,27 ± 0,75	42,02 ± 0,53	53,50 ± 1,52	63,81 ± 1,11	76,40 ± 0,54	86,97 ± 0,68
<b>5</b>	30,98 ± 1,20	39,02 ± 1,46	50,17 ± 1,11	61,43 ± 0,39	74,66 ± 0,69	85,55 ± 0,92
<b>6</b>	31,67 ± 1,44	41,96 ± 0,41	54,38 ± 1,22	62,61 ± 2,50	74,13 ± 0,31	84,15 ± 5,31
<b>7</b>	52,39 ± 0,99	62,87 ± 0,24	73,59 ± 0,55	82,83 ± 0,59	88,81 ± 0,76	92,83 ± 0,82
<b>8</b>	45,58 ± 0,71	57,05 ± 0,46	69,36 ± 0,32	79,87 ± 0,22	86,59 ± 0,10	92,28 ± 0,16
<b>9</b>	53,16 ± 1,04	65,23 ± 1,01	75,25 ± 0,57	84,45 ± 0,79	89,66 ± 0,20	92,76 ± 0,38
<b>10</b>	54,21 ± 0,97	66,24 ± 0,83	74,81 ± 0,54	82,85 ± 2,53	89,92 ± 0,23	94,13 ± 0,18
<b>11</b>	46,33 ± 1,61	57,56 ± 1,98	67,38 ± 0,61	75,22 ± 2,20	82,91 ± 0,41	86,82 ± 0,86
<b>12</b>	33,29 ± 1,52	44,50 ± 1,41	56,99 ± 1,86	64,76 ± 2,22	73,94 ± 3,52	87,39 ± 2,17
<b>13</b>	41,95 ± 0,52	51,47 ± 2,31	63,11 ± 3,09	72,22 ± 2,75	79,24 ± 3,55	87,91 ± 0,27
<b>14</b>	44,89 ± 0,64	55,93 ± 0,38	65,78 ± 0,61	75,73 ± 3,03	84,13 ± 0,71	87,22 ± 0,22
<b>15</b>	49,08 ± 0,48	58,28 ± 2,61	68,81 ± 1,66	76,38 ± 3,68	84,33 ± 0,60	87,73 ± 0,37
<b>Form. Otimizada</b>	35,88 ± 0,99	43,99 ± 0,78	54,67 ± 0,84	66,30 ± 1,74	76,16 ± 0,64	86,88 ± 0,26

NOTA: DPR < 4,90 %

APÊNDICE D – Valores médios individuais de erosão (%) das diferentes formulações em saliva artificial

Valores de erosão (%) das diferentes formulações

Form.	Tempos (% ±DP)					
	0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h
<b>1</b>	4,43 ± 0,08	4,97 ± 0,04	5,77 ± 0,28	7,95 ± 0,24	11,17 ± 0,38	22,71 ± 2,16
<b>2</b>	3,07 ± 0,09	3,42 ± 0,09	3,56 ± 0,06	3,92 ± 0,05	3,98 ± 0,07	6,79 ± 2,35
<b>3</b>	2,00 ± 0,06	2,98 ± 0,12	3,19 ± 0,07	4,69 ± 0,01	6,07 ± 0,18	10,45 ± 2,13
<b>4</b>	1,96 ± 0,01	1,95 ± 0,05	2,48 ± 0,01	2,87 ± 0,06	4,52 ± 0,06	4,93 ± 2,15
<b>5</b>	3,04 ± 0,01	2,98 ± 0,04	4,32 ± 0,18	4,63 ± 0,05	5,12 ± 0,09	5,66 ± 0,14
<b>6</b>	5,26 ± 0,12	5,94 ± 0,06	7,57 ± 0,25	8,79 ± 0,22	11,06 ± 0,38	17,01 ± 0,61
<b>7</b>	-0,52 ± 0,01	-0,10 ± 0,03	-1,52 ± 0,03	-4,49 ± 0,11	-6,84 ± 0,24	-5,42 ± 0,66
<b>8</b>	0,50 ± 0,01	0,00 ± 0,00	-0,98 ± 0,02	-1,50 ± 0,03	-3,38 ± 0,02	-11,22 ± 0,00
<b>9</b>	-0,98 ± 0,03	-1,52 ± 0,07	-3,70 ± 0,23	-4,72 ± 0,13	-9,22 ± 0,00	-12,38 ± 0,48
<b>10</b>	-0,51 ± 0,01	-2,47 ± 0,10	-1,95 ± 0,01	-3,52 ± 0,07	-0,96 ± 0,01	-13,08 ± 0,26
<b>11</b>	2,20 ± 0,35	2,42 ± 0,03	2,52 ± 0,08	2,49 ± 0,04	2,48 ± 0,01	3,58 ± 0,18
<b>12</b>	4,07 ± 0,04	5,43 ± 0,22	7,39 ± 0,37	10,33 ± 0,25	12,60 ± 0,05	24,07 ± 0,24
<b>13</b>	3,37 ± 0,06	3,34 ± 0,01	3,42 ± 0,02	3,39 ± 0,04	3,76 ± 0,05	3,48 ± 0,06
<b>14</b>	2,96 ± 0,08	2,99 ± 0,07	2,88 ± 0,09	2,56 ± 0,06	3,02 ± 0,03	5,71 ± 0,00
<b>15</b>	2,07 ± 0,02	2,63 ± 0,05	0,50 ± 0,01	1,01 ± 0,01	1,00 ± 0,01	3,11 ± 0,11
<b>Form. Otimizada</b>	2,17 ± 0,04	2,48 ± 0,13	2,48 ± 0,04	3,56 ± 0,13	5,42 ± 0,17	5,03 ± 0,13

NOTA: DPR < 5,20%

APÊNDICE E – Valores médios individuais do perfil de liberação *in vitro* do marcador químico

Valores do perfil de liberação *in vitro* do marcador químico

Form.	Tempos (% $\pm$ DP)						
	0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
1	1,35 $\pm$ 0,18	2,75 $\pm$ 0,09	5,79 $\pm$ 0,45	11,52 $\pm$ 0,68	29,92 $\pm$ 1,50	53,92 $\pm$ 1,11	100,29 $\pm$ 2,1
2	1,37 $\pm$ 0,18	2,08 $\pm$ 0,11	3,84 $\pm$ 0,27	6,84 $\pm$ 0,42	13,61 $\pm$ 0,27	20,16 $\pm$ 0,77	36,64 $\pm$ 2,37
3	1,44 $\pm$ 0,11	2,02 $\pm$ 0,10	3,37 $\pm$ 0,07	5,84 $\pm$ 0,09	11,68 $\pm$ 0,32	17,01 $\pm$ 0,43	31,14 $\pm$ 0,95
4	1,04 $\pm$ 0,03	1,69 $\pm$ 0,11	3,03 $\pm$ 0,22	5,78 $\pm$ 0,12	11,36 $\pm$ 0,23	16,77 $\pm$ 0,31	28,03 $\pm$ 1,67
5	1,36 $\pm$ 0,08	2,25 $\pm$ 0,04	3,73 $\pm$ 0,23	6,48 $\pm$ 0,30	12,82 $\pm$ 0,20	17,87 $\pm$ 0,24	35,71 $\pm$ 2,50
6	1,38 $\pm$ 1,44	2,52 $\pm$ 0,07	4,35 $\pm$ 0,16	9,31 $\pm$ 0,42	22,60 $\pm$ 0,91	43,19 $\pm$ 1,78	96,79 $\pm$ 0,40
7	2,12 $\pm$ 0,09	3,88 $\pm$ 0,26	6,45 $\pm$ 0,19	12,41 $\pm$ 0,80	22,68 $\pm$ 0,83	31,66 $\pm$ 1,28	50,94 $\pm$ 2,40
8	1,87 $\pm$ 0,11	3,68 $\pm$ 0,16	6,47 $\pm$ 0,37	11,95 $\pm$ 0,45	21,65 $\pm$ 0,83	32,73 $\pm$ 2,29	61,93 $\pm$ 2,56
9	1,82 $\pm$ 0,09	3,55 $\pm$ 0,10	6,11 $\pm$ 0,46	11,58 $\pm$ 0,47	21,40 $\pm$ 0,90	30,85 $\pm$ 1,39	49,95 $\pm$ 2,76
10	1,98 $\pm$ 0,19	3,75 $\pm$ 0,30	6,11 $\pm$ 0,36	12,37 $\pm$ 0,44	22,90 $\pm$ 0,37	31,14 $\pm$ 0,48	46,09 $\pm$ 0,53
11	1,38 $\pm$ 0,13	2,91 $\pm$ 0,19	4,81 $\pm$ 0,34	8,92 $\pm$ 0,65	17,54 $\pm$ 1,57	25,75 $\pm$ 1,98	42,38 $\pm$ 2,91
12	1,40 $\pm$ 0,19	2,57 $\pm$ 0,11	4,45 $\pm$ 0,26	9,17 $\pm$ 0,57	28,20 $\pm$ 0,48	55,13 $\pm$ 3,74	98,45 $\pm$ 0,44
13	1,24 $\pm$ 0,71	2,58 $\pm$ 0,11	4,42 $\pm$ 0,04	7,36 $\pm$ 0,28	15,25 $\pm$ 0,69	21,30 $\pm$ 0,64	37,15 $\pm$ 1,86
14	1,42 $\pm$ 0,06	2,58 $\pm$ 0,09	4,30 $\pm$ 0,09	8,77 $\pm$ 0,40	17,30 $\pm$ 0,69	23,71 $\pm$ 0,90	41,15 $\pm$ 1,10
15	1,80 $\pm$ 0,04	2,97 $\pm$ 0,06	6,20 $\pm$ 0,08	11,71 $\pm$ 0,37	21,49 $\pm$ 0,17	28,36 $\pm$ 0,21	46,11 $\pm$ 0,75
Form. Otimizada	1,33 $\pm$ 0,07	2,44 $\pm$ 0,12	4,04 $\pm$ 0,15	6,79 $\pm$ 0,29	16,29 $\pm$ 0,84	23,15 $\pm$ 0,64	50,19 $\pm$ 3,90

NOTA: DPR < 13,82% no primeiro ponto e DPR < 8,47% nos demais pontos