



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ARISA DOS SANTOS FERREIRA

**OBTENÇÃO DE FILMES MUCOADESIVOS À BASE DE *Thuja occidentalis* Linn
COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE ORAL**

Recife
2020

ARISA DOS SANTOS FERREIRA

**OBTENÇÃO DE FILMES MUCOADESIVOS À BASE DE *Thuja occidentalis* Linn
COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Orientador: Prof^o. Dr. Pedro José Rolim Neto

Recife
2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F383o Ferreira, Arisa dos Santos.
Obtenção de filmes mucoadesivos à base de *Thuja occidentalis* Linn como alternativa ao tratamento da candidíase oral / Arisa dos Santos Ferreira. – 2020.
95 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Pedro José Rolim Neto.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Candidíase. 2. Mucosa bucal. 3. Thuja. 4. Filmes mucoadesivos. I. Rolim Neto, Pedro José (Orientador). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-064)

ARISA DOS SANTOS FERREIRA

**OBTENÇÃO DE FILMES MUCOADESIVOS À BASE DE *Thuja occidentalis* Linn
COMO ALTERNATIVA AO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 20/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Elba Lucia Cavalcante de Amorim (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Larissa Araújo Rolim (Examinador Externo)
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Dedico esse trabalho aos meus pais, André e Cláudia, por todo incentivo, apoio e principalmente por todo amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, por ter me dado forças, graça e sabedoria. Por sempre estar comigo, e se mostrar fiel em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, André Ferreira e Cláudia Ferreira, por me apoiarem em todas as decisões da minha vida. Ao meu pai, por ser realmente um homem de exemplo e por fazer tudo pelo meu crescimento profissional e por achar que tem a filha mais inteligente do mundo. A minha mãe, por todos os conselhos e orações. Esse trabalho é por vocês!

À Cristal, minha amiga, minha irmã e minha cachorrinha. Por ser minha melhor amiga, ser um ponto de paz na minha vida e refúgio em momentos difíceis. Por me acordar com beijos todos os dias, e me obrigar a dividir toda e qualquer comida com ela (sei que ela nunca vai ler isso, mas só quem tem e ama um animal sabe como é essa gratidão pela vida deles).

Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto, por ser essa pessoa de coração tão bom! Por ter me aceito no LTM e ter me dado essa oportunidade, por vezes tão distante da realidade de alunos de faculdades particulares, muito obrigada professor! Obrigada, por além de professor e orientador, ser nosso amigo, por todas as risadas e conversas que tivemos no laboratório. Que Deus abençoe sempre a sua vida!

A minha amiga, parceira e dupla de laboratório e da vida, Williana Tôrres, por todo apoio (moral, braçal e psicológico); por, diversas vezes, ter dado uma pausa nas suas preocupações pra se preocupar com as minhas, por ser uma pessoa tão gentil e solícita, por me dar conselhos sem saber o que faz na própria vida/projeto e principalmente por me aguentar TODO SANTO DIA, obrigada!

A minha estagiaria e amiga, Manuela Erhardt, por me trazer alegria sempre que chega! Por me ajudar sem eu nem pedir, por me incentivar e sempre ver o lado bom das coisas (e meu também). Impossível não amar essa menina!

À Dayvid Batista, pela amizade. Por todas as conversas, risadas e choros compartilhados nesses dois anos de mestrado.

A todos do grupo LTM, principalmente por serem uma família. Posso afirmar que todos tiveram uma participação especial nesse momento da minha vida. Agradeço, em especial a Prof^a. Dr^a Rosali Ferreira, por ter me adotado e esclarecido

diversas dúvidas que me surgiram nesse processo, à Prof^a Larissa Rolim por em cinco minutos me ensinar o que eu passei uma semana lutando pra entender e à Larissa Morgana, por ser minha mentora desde o princípio e por dividir atualmente o projeto tuia comigo.

À Ilka Barbosa, Myla Lobo, Stéfani Oliveira, Widson Santos, Adriana Yun, Aline Silva, Emerson Silva, Pollyne Amorim, Talita Rosa, Rafael Portela e Mariana Monteiro, pelas diversas vezes que me ajudaram e me acalmaram.

Ao Laboratório de Micologia Médica (UFPE), em especial à Dra. Daniela Buonafina, pela contribuição na realização dos ensaios antifúngicos.

Ao Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia, na pessoa de Vinicius Couto, pela realização das Microscopias Eletrônicas de Varredura.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de participar deste momento especial.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente com a realização deste trabalho.

“Porque dEle, e por Ele, e para Ele são todas as coisas” (BÍBLIA, Romanos 11:36)

RESUMO

A microbiota oral humana é comumente composta por diferentes espécies do gênero *Candida* sp., porém, casos de desordens endócrinas proporcionam o desenvolvimento de infecções fúngicas oportunistas nesta região. Os relatos comuns de resistência das opções terapêuticas existentes contra essas infecções, junto a estudos que mostram resultados positivos da ação anticândida da espécie botânica *Thuja occidentalis* Linn, levaram a desenvolver uma forma farmacêutica, a base deste material vegetal, como forma alternativa ao tratamento da candidíase oral. Para este fim, obteve-se o extrato etanólico 70% e todos os controles de qualidades foram realizados. Um método para determinação do teor de flavonoides totais foi desenvolvido e validado. O extrato etanólico foi seco em estufa, utilizando o manitol como adjuvante de secagem, e caracterizado. O extrato etanólico e o extrato seco foram testados contra cepas de *Candida* sp. e ambos utilizados no desenvolvimento tecnológico de filmes orais mucoadesivos. Os lotes com melhores aspectos macroscópicos foram avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), uniformidade de peso, espessura, desintegração, índice de intumescimento e tempo de mucoadesão. O método para determinação do teor de flavonoides mostrou-se linear, robusto, preciso, seletivo e exato; obtendo-se, o teor de $15,53 \pm 0,438$ expresso em quercetina por grama de extrato etanólico. Ambos os extratos mostraram atividade antifúngica contra todas as cepas de *Candida* sp. testadas. Macroscopicamente, os melhores lotes de filmes mucoadesivos foram aqueles obtidos com a goma de celulose e com carboximetilcelulose (CMC), que apresentaram tempo de desintegração maior que 120 minutos, índice de intumescimento de 45 à 120% e tempo de mucoadesão de 71,36 à 96,12 minutos. Os resultados permitem inserir estes filmes mucoadesivos como uma proposta promissora para desenvolvimento na área farmacêutica, sendo alternativa ao tratamento da candidíase oral, uma vez que iniciativas públicas mostram um crescente interesse na ampliação do mercado fitoterápico no Brasil.

Palavras-chave: Candidíase. Mucosa bucal. Thuja. Filmes mucoadesivos.

ABSTRACT

The human oral microbiota is commonly composed of different species of the genus *Candida sp.*, cases of endocrine disorders provide the development of opportunistic fungal infections in this region, however. The common reports of resistance of the existing therapeutic options against these infections, together with studies that show positive results of the anticandid action of the botanical species *Thuja occidentalis* Linn, led to development of a pharmaceutical form, a base of this plant material, as an alternative to the treatment of oral candidiasis. For this purpose, 70% ethanolic extract was obtained and all quality controls were performed. A method for determining the content of total flavonoids was developed and validated. The ethanolic extract was dried in an oven, using mannitol as a drying aid, and characterized. The ethanolic extract and the dry extract were tested against strains of *Candida sp.* and both used in the technological development of mucoadhesive oral films. The batches with the best macroscopic aspects were evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM), weight uniformity, thickness, disintegration, swelling index and mucoadhesion time. The method for determining the flavonoid content proved to be linear, robust, precise, selective and accurate; obtaining the content of 15.53 ± 0.438 expressed in quercetin per gram of ethanolic extract. Both extracts showed antifungal activity against all strains of *Candida sp.* tested. Macroscopically, the best batches of mucoadhesive films are those that suffer from cellulose gum and carboxymethylcellulose (CMC), which record the disintegration time greater than 120 minutes, the swelling rate of 45 to 120% and the mucoadhesion time of 71, 36 to 96, 12 minutes. The results allow inserting these mucoadhesive films as a promising proposal for development in the pharmaceutical area, being an alternative to the treatment of oral candidiasis, since public initiatives show a growing interest in the expansion of the herbal medicine market in Brazil.

Keywords: Candidiasis. Oral mucosa. Thuja. Mucoadhesive films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	(A) Colônias de <i>Candida</i> sp. na forma leveduriforme.(B) Colônias de <i>Candida</i> sp. na forma filamentosa.....	22
Figura 2 –	Principais razões de indeferimento das solicitações de registro de medicamentos fitoterápicos.....	28
Figura 3 –	Folha de <i>Thuja occidentalis</i> Linn.....	30
Figura 4 –	Estrutura química da alfa-tujona.....	32
Figura 5 –	Representação esquemática das diferentes mucosas orais	33
Figura 6 –	Interação entre a mucina presente na mucosa oral e os polímeros constituintes do filme mucoadesivo.....	34
Figura 7 –	Esquema do processo de obtenção dos filmes à base de HPMC, Goma de celulose, CMC e Goma guar.....	47
Figura 8 –	Curva de TG do extrato etanólico de <i>T. occidentalis</i>	54
Figura 9 –	Espectro de varredura do extrato de <i>T. occidentalis</i> comprovando o comprimento de 409 nm como o de maior absorvância.....	55
Figura 10 –	Avaliação da cinética de complexação entre flavonoides e $AlCl_3$	56
Figura 11 –	Avaliação do perfil de absorvância obtido a partir da variação de volumes da solução de $AlCl_3$	57
Figura 12 –	Avaliação das curvas de absorvância obtidas a partir da variação no volume de $AlCl_3$	57
Figura 13 –	Curva de calibração da quercetina.....	58
Figura 14 –	Esquema ilustrado da complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio ($AlCl_3$) (A) e intensificação da colocação amarela (B).....	59
Figura 15 –	Espectros de varredura mostrando a seletividade do método.....	60
Figura 16 –	Curva de regressão linear obtida a partir da média de três curvas autênticas do extrato de <i>T. occidentalis</i>	60
Figura 17 –	Perfil da dispersão dos resíduos do ensaio de linearidade..	61

Figura 18 –	Imagem macroscópica do extrato seco de <i>T. occidentalis</i> ...	65
Figura 19 –	Distribuição granulométrica do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	66
Figura 20 –	Curva de retenção e passagem do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	66
Figura 21 –	Espectros na região do infravermelho obtidos sobre o manitol puro, extrato seco de <i>T. occidentalis</i> e do flavonóide quercetina.....	67
Figura 22 –	Estrutura química do manitol.....	68
Figura 23 –	Estrutura química do flavonoide quercetina.....	68
Figura 24 –	Curva de TG do extrato seco de <i>T. occidentalis</i>	69
Figura 25 –	Filmes base obtidos.....	72
Figura 26 –	Formulação obtida a partir da goma de celulose com extrato seco de <i>T. occidentalis</i> incorporado (A) e formulação obtida a partir do CMC com o extrato etanólico incorporado (B).....	73
Figura 27 –	Forma de plástico utilizada para secagem dos filmes.....	74
Figura 28 –	(A) Filmes de HPMC obtidos com extrato seco (B) Filmes de HPMC obtidos com extrato etanólico.....	75
Figura 29 –	Filmes de goma de celulose com extrato seco (LB6) e filmes de CMC com extrato etanólico (LB10).....	76
Figura 30 –	Eletromicrografias do filme LB6.....	76
Figura 31 –	Eletromicrofotografias do filme LB10.....	77
Figura 32 –	Índice de intumescimento dos filmes de goma de celulose..	80
Figura 33 –	Índice de intumescimento dos filmes de CMC.....	80
Figura 34 –	Filme de goma de celulose aderido à mucosa jugal de suíno.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Lotes de bancada das formulações base dos filmes orais desenvolvidos.....	47
Tabela 2 –	Formulações finais dos filmes mucoadesivos.....	48
Tabela 3 –	Níveis de variáveis do planejamento quantitativo do polímero mucoadesivo da formulação.....	49
Tabela 4 –	Lotes de bancada obtidos a partir da planificação quantitativa dos polímeros mucoadesivos.....	49
Tabela 5 –	Controles de qualidade físico-químicos da solução extrativa.....	53
Tabela 6 –	Análise do ensaio da robustez do método.....	62
Tabela 7 –	Análise do ensaio de precisão.....	63
Tabela 8 –	Recuperação da quercetina em amostras do extrato de <i>T. occidentalis</i>	64
Tabela 9 –	Concentrações Inibitórias Mínimas capazes de inibir 50% do inóculo (CIM50) dos extratos de <i>T. occidentalis</i> frente cepas de <i>Candida</i> sp.....	70
Tabela 10 –	Uniformidade de peso e espessura dos filmes obtidos.....	78
Tabela 11 –	Tempo de mucoadesão obtido para os filmes de goma de celulose e CMC.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATR	<i>Attenuated Total Reflectance</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CMC	Carboximetilcelulose
DL ₅₀	Dose Letal 50%
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EQ	Equivalente de Quercetina
et al.	e outros
FT-IR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GM/MS	Gabinete do Ministério/Ministério da Saúde
GHS	<i>Globally Harmonized System</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HPMC	Hidroxipropilmetil Celulose
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i>
IPA	Instituto Agrônomo de Pernambuco
IV	Infravermelho
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
kV	Quilovolts
L.	Linn
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Na ₂ HPO ₄	Fosfato Dibásico de Sódio
NaCl	Cloreto de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução Especial
RPM	Rotações por Minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SOP	Síndrome do Ovário Policístico
SUS	Sistema Único de Saúde
TG	Termogravimetria
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV-Vis	Ultravioleta Visível
% m/v	Percentual massa/volume
% p/p	Percentual peso/peso
% v/v	Percentual volume/volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Objetivos.....	20
1.1.1	Objetivo geral.....	20
1.1.2	Objetivos específicos.....	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	CANDIDÍASE.....	21
2.1.1	Candidíase oral.....	22
2.2	TRATAMENTO.....	24
2.3	PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS.....	26
2.3.1	<i>Thuja occidentalis</i> Linn.....	29
2.4	FILMES MUCOADESIVOS COMO FORMA FARMACÊUTICA.....	32
2.4.1	Cavidade oral.....	33
2.4.2	Mucoadesão.....	33
2.4.3	Filmes mucoadesivos.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	37
3.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>Thuja occidentalis</i>	37
3.2.1	Controles de qualidade físico-químicos do extrato etanólico a base de <i>T. occidentalis</i>.....	37
3.2.1.1	Determinação do pH.....	37
3.2.1.2	Determinação da densidade relativa.....	38
3.2.1.3	Determinação do grau alcoólico.....	38
3.2.1.4	Determinação do resíduo seco.....	39
3.2.1.5	Determinação do perfil térmico.....	39

3.3	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV.....	39
3.3.1	Matérias-primas.....	39
3.3.2	Desenvolvimento do método analítico.....	40
3.3.2.1	Obtenção da solução extrativa e solução mãe.....	40
3.3.2.2	Seleção do comprimento de onda e diluição das amostras....	40
3.3.2.3	Determinação do tempo de leitura.....	40
3.3.2.4	Avaliação do volume da solução de cloreto de alumínio.....	41
3.3.2.5	Desenvolvimento da curva-padrão.....	41
3.3.3	Validação dos procedimentos analíticos.....	41
3.3.3.1	Seletividade.....	41
3.3.3.2	Linearidade.....	41
3.3.3.3	Robustez.....	42
3.3.3.4	Precisão.....	42
3.3.3.5	Exatidão.....	42
3.3.4	Determinação do teor de flavonoides totais.....	43
3.4	SECAGEM DO EXTRATO ETANÓLICO.....	43
3.4.1	Controles de qualidade físico-químicos do extrato seco à base de <i>T. occidentalis</i>.	44
3.4.1.1	Perda por dessecação (método gravimétrico)	44
3.4.1.2	Determinação granulométrica.....	44
3.4.1.3	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	45
3.4.1.4	Determinação do perfil térmico do extrato seco.....	45
3.5	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO ETANÓLICO E SECO DE <i>Thuja occidentalis</i>	45

3.6	OBTENÇÃO DE FILMES MUCOADESIVOS CONTENDO EXTRATO DE <i>Thuja occidentalis</i>	46
3.6.1	Desenvolvimento das formulações base dos filmes mucoadesivos.....	46
3.6.2	Formulação final do filme mucoadesivo.....	48
3.6.3	Controles de qualidade dos filmes mucoadesivos.....	50
3.6.3.1	Aspecto visual.....	50
3.6.3.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	50
3.6.3.3	Espessura dos filmes orais.....	50
3.6.3.4	Tempo de desintegração.....	51
3.6.3.5	Índice de intumescimento.....	51
3.6.3.6	Tempo de mucoadesão <i>in vitro</i>	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1	OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E CONTROLES FÍSICO-QUÍMICOS.....	53
4.1.1	Perfil térmico do extrato etanólico.....	54
4.2	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV.....	54
4.2.1	Desenvolvimento do método analítico.....	54
4.2.1.1	Seleção do comprimento de onda e diluição das amostras....	54
4.2.1.2	Determinação do tempo de leitura.....	55
4.2.1.3	Avaliação do volume da solução de cloreto de alumínio.....	56
4.2.1.4	Desenvolvimento da curva padrão.....	58
4.2.2	Validação dos procedimentos analíticos.....	58
4.2.2.1	Seletividade.....	58
4.2.2.2	Linearidade.....	60

4.2.2.3	Robustez.....	61
4.2.2.4	Precisão.....	62
4.2.2.5	Exatidão.....	63
4.2.3	Determinação do teor de flavonoides totais.....	64
4.3	OBTENÇÃO E CONTROLES DO EXTRATO SECO À BASE DE <i>T. occidentalis</i>	64
4.3.1	Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	66
4.3.2	Perfil térmico do extrato seco.....	69
4.4	TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA <i>IN VITRO</i> DO EXTRATO ETANÓLICO E SECO DE <i>Thuja occidentalis</i>	69
4.5	OBTENÇÃO DE FILMES MUCOADESIVOS CONTENDO EXTRATO DE <i>Thuja occidentalis</i>	71
4.5.1	Desenvolvimento dos lotes de bancada dos filmes-base mucoadesivos.....	71
4.5.2	Filmes mucoadesivos incorporados dos extratos etanólico e seco de <i>T. occidentalis</i>.....	74
4.5.2.1	Aspecto visual.....	74
4.5.2.2	Controles de qualidade físico-químico dos filmes mucoadesivos.....	78
4.5.2.3	Índice de intumescimento.....	79
4.5.2.4	Tempo de mucoadesão <i>in vitro</i>	81
5	CONCLUSÃO.....	84
5.1	PERSPECTIVAS.....	85
	REFERÊNCIAS.....	86
	ANEXO A - TRABALHO APRESENTADO NO 9TH INTERNATIONAL PHYTOCOSMETICS AND PHYTOTHERAPY CONGRESS.....	95

1 INTRODUÇÃO

A candidíase é uma infecção fúngica oportunista muito comum, causada por diferentes espécies do gênero *Candida* sp. Dentre as espécies pertencentes a esse gênero, *C. albicans* é a de maior importância clínica, sendo o agente etiológico mais frequente das patologias orais (ANDREOLA et al., 2016).

Visto que este fungo é parte da microbiota normal humana, desordens endócrinas, nutricionais e fisiológicas, discrasias sanguíneas, malignidades e alterações imunológicas mostram-se como fatores predisponentes dessas infecções (ARENDORF; WALKER, 1980; TARÇIN, 2011; MILLSOP; FAZEL, 2016).

O diagnóstico geralmente é feito de forma clínica, baseando-se em sinais e sintomas e no histórico médico e odontológico do paciente. Quando isto não é o suficiente, alguns testes laboratoriais podem ser feitos de forma adicional e comprobatória (SINGH et al., 2014).

Fármacos, como nistatina, miconazol, fluconazol, itraconazol e anfotericina B, são as opções terapêuticas existentes na prática clínica, sendo este último indicado para casos mais severos. Porém os relatos de aumento da resistência das diferentes espécies de *Candida* sp. contra esses agentes farmacológicos são constantes, causando preocupação entre médicos e pesquisadores (ANDRADE, 2017; ASLANI et al., 2018).

Avaliando esse perfil de resistência, as plantas surgem como uma interessante proposta para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas anticândida. Espécies como *Allium sativum* (alho), *Ricinus communis* (mamona), *Melaleuca atnerfolia* (Árvore-de-chá), *Uncaria tomentosa* (Unha de gato), *Cymbopogon citratus* (Capim-limão) e *Punica granatum* (Romã), por exemplo, reúnem bons resultados fungicidas e fungistáticos para as diferentes cepas dessa classe fúngica (PÁDUA et al., 2013; SPOHR, 2013; FREIRE et al., 2016).

A espécie *Thuja occidentalis* Linn, conhecida como “tuia” ou “cipreste” no Brasil, é uma conífera pertencente à família Cupressaceae, que também demonstrou potencial anticândida existente no óleo essencial de suas folhas e em alguns extratos (NASER et al., 2005; ALVES et al., 2014).

Porém, apesar desse elevado número de espécies vegetais que demonstram ação anticândida, o aproveitamento e incorporação desse potencial no

desenvolvimento e aprimoramento de medicamentos ainda é pequeno (LIMA et al., 2006; NGO et al., 2013).

Portanto, tendo em vista a biodiversidade vegetal e as políticas públicas de incentivo ao estudo, desenvolvimento e produção de fitoterápicos no Brasil, no presente trabalho foi proposto o desenvolvimento de uma alternativa farmacêutica para o tratamento da candidíase oral, sendo os filmes mucoadesivos a forma farmacêutica de escolha, por ser uma opção inovadora que permite tratar a infecção de maneira local, ter ação prolongada do ativo e ser de simples administração (BORGES et al., 2015; SPEER; PREIS; BREITKREUTZ, 2019).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Obter filmes mucoadesivos, à base do extrato de *Thuja occidentalis*, para tratamento alternativo de infecções orais por *Candida sp.*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Obter extrato etanólico de *T. occidentalis* e realizar os testes de controle de qualidade físico-químicos;
- Desenvolver e validar metodologia espectrofotométrica no UV para o doseamento do extrato etanólico obtido;
- Obter extrato seco de *T. occidentalis* e realizar os testes de controle de qualidade físico-químicos;
- Realizar estudos *in vitro* para avaliar a atividade fúngica do extrato etanólico e seco, desenvolvida frente a diferentes cepas do gênero *Candida sp.*;
- Desenvolver Lotes de Bancada dos filmes mucoadesivos à base de *T. occidentalis*, através de uma planificação qualitativa e quantitativa dos excipientes;
- Realizar os testes de controle de qualidade físico-químicos dos melhores lotes de bancada desenvolvidos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CANDIDÍASE

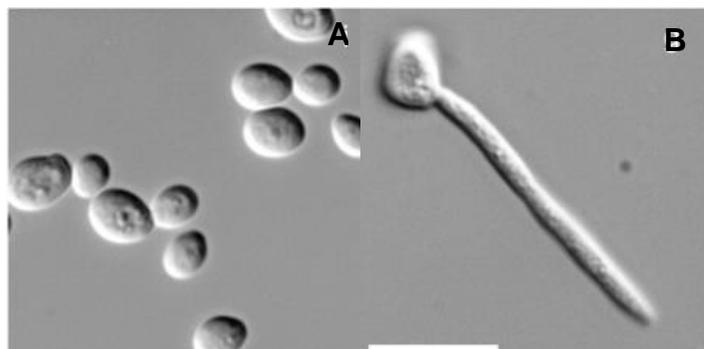
Candida spp é classificada taxonomicamente no reino Fungi, divisão Eumycota, subdivisão Deuteromycotina, classe Blastomycetes e família Cryptococcacea. Possui aproximadamente 200 espécies, sendo *Candida albicans* a espécie predominantemente relacionada aos casos de patogenicidade, por ser a mais frequentemente isolada em humanos, representando cerca de 50% – 70% dos casos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SILVA; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2017).

Embora *C. albicans* seja a mais frequentemente isolada, estudos mostram algumas outras espécies com um significado clínico representativo. Na América do Norte e Europa, por exemplo, *C. glabrata* é bastante prevalente. Já na América do sul e Ásia, estudos mostram a incidência de *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* entre as espécies não-albicans (VILA et al., 2016). Somadas a *C. krusei*, essas espécies de *Candida spp.* equivalem a cerca de 95% das infecções por esse gênero. Espécies como *C. guilliermondii*, *C. lusitaniae*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. inconspicua*, *C. rugosa*, *C. dubliniensis* e *C. norvegensis* são relatadas com menor frequência (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; SILVA; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2017).

Também chamada de candidose, a candidíase, é uma infecção fúngica oportunista muito comum causada pelas diferentes espécies do gênero *Candida spp.* que, por sua vez, fazem parte da microbiota normal do ser humano e são facilmente encontradas na mucosa oral, pele, no trato gastrointestinal e geniturinário do hospedeiro (PEIXOTO et al., 2014; NAMI et al., 2019).

A relação simbiótica entre flora microbiana e hospedeiro é importante para a manutenção do equilíbrio homeostático no corpo. Porém, fatores como comprometimento do sistema imune, mudanças de pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura e antibióticos de amplo espectro são facilitadores da patogenicidade das espécies que compõe essa microbiota. Nessas situações, *Candida sp.* é capaz de modificar-se fenotipicamente, passando da conformação leveduriforme (Figura 1A) para a forma de hifa (Figura 1B), sendo essa habilidade de transformação um dos principais arsenais para sua capacidade de invasão tecidual e formação de biofilmes (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; SPOHR, 2013; CHANDA et al., 2017).

Figura 1 - (A) Colônias de *Candida sp.* na forma leveduriforme. (B) Colônias de *Candida sp.* na forma filamentososa.



Fonte: (VESES; GOW, 2009)

Essa infecção pode se manifestar clinicamente de diferentes formas, geralmente as manifestações que acometem pele e mucosas tendem a ser mais brandas, como é o caso das candidíases orofaríngea e vulvovaginal, que se apresentam de forma local, onde a população fúngica forma pequenas placas ou nódulos branco-amarelados na parede mucótica da boca e da vagina, respectivamente. Porém acontecem com uma maior frequência, afetando a qualidade de vida dos indivíduos (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; PEIXOTO et al., 2014; SILVA, 2015; HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016).

Em quadros de danos ao sistema imunológico mais severos, a doença pode tornar-se invasiva e chegar a nível sistêmico. É o que acontece com pacientes de terapias agressivas, como por exemplo, quimioterapia antineoplásica e também nos pacientes submetidos ao tratamento, a longo prazo, com corticosteroides ou transplante de órgãos, por exemplo. Nesses casos, há uma maior facilidade para leveduras do gênero *Candida sp.* chegarem à corrente sanguínea e serem disseminadas para sítios anatômicos como: pulmão, rins, coração e fígado. Dessa forma, a infecção passa a ser chamada de candidemia (GIOLO; SVIDZINSKI, 2010; PEIXOTO et al., 2014; SILVA, 2015), que é a forma mais grave da doença, sendo fatal em 40% dos casos, mesmo com a aderência terapêutica (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; VILA et al., 2016).

2.1.1 Candidíase oral

Devido à capacidade de aderência a diversas superfícies da cavidade bucal, leveduras pertencentes ao gênero *Candida sp.* são habitantes comuns dessa região, tanto de adultos quanto de crianças (GOUVÊA-MONDIN, 2005; O'DONNELL et al., 2015). *C. albicans* é componente da microflora oral de cerca de 30% a 50% das pessoas, sendo a mais prevalente e de maior patogenicidade na região (CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011). Contudo, as espécies *Candida glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. tropicalis* também são recuperadas na mucosa oral de pacientes (TARÇIN, 2011; HEBECKER et al., 2014; SINGH et al., 2014).

Vários fatores são relatados como predisponentes da infecção nessa região: extremos de idade (muito comum em crianças e idosos), déficits alimentares, prótese dentária, tabagismo e fluxo salivar, alterações hormonais, nutricionais ou imunológicas (GOUVÊA-MONDIN, 2005; GOULART et al., 2018). Também é uma das manifestações clínicas iniciais mais comuns em pacientes infectados pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), estando presente em cerca de 90% dos casos (HEBECKER et al., 2014).

Glândulas salivares com suas funções prejudicadas estão associadas a um risco aumentado de candidíase oral. Com o fluxo reduzido de saliva, a concentração de anticorpos específicos anticândida e proteínas ricas em histidina e com ação antimicrobianas, como lactoferrina, sialoperoxidase, lisozima, polipeptídeos, fica comprometida, permitindo o crescimento de diversos microrganismos (HEBECKER et al., 2014; SINGH et al., 2014).

A candidíase oral possui uma variedade de formas de manifestação clínica. É classificada considerando a localização da infecção, profundidade de invasão epitelial e resposta do hospedeiro (HEBECKER et al., 2014; PILZ; CARRARD, 2015). MILLSOP e colaboradores (2016) dividem essa infecção em dois grandes grupos: candidíase oral branca e candidíase oral eritematosa.

As duas principais representantes da candidíase branca são: candidíase pseudomembranosa, mais comumente conhecida como “sapinho”, e candidíase hiperplásica. A primeira é caracterizada pela presença de placas pastosas brancas (ou amareladas) na língua, palato duro ou mole e mucosa jugal que cedem à raspagem (PILZ; CARRARD, 2015). Normalmente, os pacientes são assintomáticos,

mas, nos casos sintomáticos inúmeros, são os relatos de sensação oral ardente, mudança de gostos e tendência de sangramento na região. Já a candidíase hiperplásica, também é caracterizada pela presença de nódulos brancos e assintomáticos, porém, nesses casos, não é possível a retirada por meio da raspagem (HEBECKER et al., 2014; AGUIAR, 2016; MILLSOP; FAZEL, 2016).

Já no grupo de candidíase eritematosas, incluem-se: candidíase atrófica aguda e crônica, glossite romboide mediana, queilite angular e eritema gengivar linear, podendo ser desencadeados pelo uso de antibióticos, de corticoides, tabagismo ou próteses (MILLSOP; FAZEL, 2016). Elas são caracterizadas por manchas avermelhadas comumente no dorso da língua, palato e mucosa bucal (TARÇIN, 2011).

AXELL e colaboradores (1997) propuseram uma classificação onde a infecção é dividida em: candidíase oral primária e candidíase oral secundária. Na primária enquadram-se as manifestações agudas, crônicas, cândida associada a lesões, além das lesões queratinizadas infectadas com cândida. Já a secundária agrupa manifestações sistêmicas decorrente da mucosa oral (TARÇIN, 2011; SINGH et al., 2014).

O diagnóstico primário é o clínico, baseado em sinais e sintomas e no histórico médico e odontológico do paciente. Porém, quando não é suficiente, alguns testes laboratoriais podem ser feitos de forma adicional e comprobatória, sendo escolhido o teste mais adequado, de acordo com as características da infecção. Quando possível a raspagem da região (pseudomembranosa, por exemplo), pode-se usar a técnica citológica do esfregaço para realizar a análise. Já para casos de candidíase hiperplásica, a biopsia se mostra particularmente adequada. Semeio, amostras de saliva ou do enxague bucal também são aplicáveis para diagnósticos laboratoriais (TARÇIN, 2011; SINGH et al., 2014; PILZ; CARRARD, 2015; MILLSOP; FAZEL, 2016).

2.2 TRATAMENTO

O tratamento da candidíase é feito através de agentes antifúngicos por via tópica, oral e endovenosa. Esses agentes podem ter efeito fungicida, quando matam o fungo, ou efeito fungistáticos, quando apenas inibem o crescimento desses organismos (KUMAR; JHA, 2017). Os fármacos podem ser de fonte sintética ou

natural. Na terapêutica três classes de drogas são usadas majoritariamente, são elas: azólicos, equinocandinas e polienos (CAMPOY; ADRIO, 2016).

Os polienos são a classe mais antiga de fármacos antifúngicos, tendo registros de uso desde a década de 1950. Embora vários agentes poliênicos tenham sido descobertos, devido à solubilidade, estabilidade, absorção e toxicidade, a utilização desses produtos ficou limitada, sendo representados basicamente pela anfotericina B e pela nistatina, que são dois fármacos de estrutura química e mecanismo de ação muito semelhantes, baseando-se na interação específica com o ergosterol, um esteroide presente na membrana celular fúngica. Apesar dessa grande afinidade com o ergosterol, os polienos também conseguem interagir com os esteróis de mamíferos (colesterol), provocando grande parte dos efeitos adversos dessa classe terapêutica. Casos de resistência à anfotericina B são pouco comuns, porém tem sido reportada ocasionalmente para isolados de *C. lusitaniae* e *C. parapsilosis* (SILVA, 2015; PEREIRA, 2017; NAMI et al., 2019).

Os fármacos azólicos são os mais prescritos na prática clínica. Podem ser divididos em dois subgrupos: imidazólicos e os tiazólicos. O primeiro é representado por drogas como cetoconazol, miconazol e clotrimazol, porém apresentam alta toxicidade, comprometendo sua utilização. Os tiazólicos são os mais utilizados dessa classe. Representados por fluconazol, itraconazol e voriconazol, possuem um excelente espectro e perfil de segurança (CASTRO et al., 2016).

Contudo, o fluconazol, que é utilizado como medicamento de primeira linha em muitos centros, tem trazido certa preocupação quanto ao surgimento de resistência, principalmente entre as espécies de *Candida krusei* e *C. glabrata* (SILVA, 2015). Já o voriconazol é um fármaco de segunda geração sintetizado a partir do fluconazol. Foi desenvolvido com o intuito de ampliar o espectro de atividade dos azólicos, possuindo uma atividade muito superior aos outros antifúngicos da classe e sendo considerado um agente de primeira linha (CAMPOY; ADRIO, 2016; KUMAR; JHA, 2017; NAMI et al., 2019).

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos que atuam em nível de parede celular, o que proporciona uma baixa toxicidade para humanos quando comparados com os azólicos (SILVA, 2015). Relatos de resistência desenvolvida contra essa classe também são raros. Possuem perfil emergencial devido a sua solubilidade, espectro antifúngico e propriedades farmacocinéticas, na prática clínica são escolha em casos de pacientes contaminados com cepas de *Candida spp.* com

resistência a azólicos ou alérgicos e/ou intolerantes à anfotericina B. São representantes dessa classe a caspofungina, micafungina e anidulafungina (KUMAR; JHA, 2017; NAMI et al., 2019).

Dentre essas opções terapêuticas, nistatina ou miconazol são os agentes tópicos de escolha para candidíases orais superficiais. Fármacos como fluconazol e itraconazol são os indicados para infecções orais mais profundas ou recorrentes. Em casos mais severos ou de resistência, o tratamento pode ser feito com anfotericina B (MIRANDA-CADENA et al., 2018; ASLANI et al., 2018) .

O uso rotineiro desses agentes antifúngicos propicia o surgimento de espécies resistentes, trazendo a necessidade de desenvolver novos agentes de maior eficácia. Contudo, quando comparado aos novos fármacos antibacterianos, é difícil o desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos, uma vez que boa parte dos alvos potenciais da terapia antifúngica são alvos também encontrados em humanos (CAMPOY; ADRIO, 2016; NAMI et al., 2019).

Partindo disso, os materiais vegetais com potencial antifúngico surgem como uma interessante alternativa de estudo para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas (PÁDUA et al., 2013; SPOHR, 2013; FREIRE et al., 2016).

2.3 PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS

Durante muito tempo, o uso de plantas foi o principal recurso terapêutico utilizado para tratar a saúde das pessoas e de suas famílias. Esses produtos têm registros de utilização para fins medicinais desde os tempos antigos. Um exemplo disso é o uso de *Papaver somniferum*, a partir da qual a morfina foi isolada, e que é descrita há mais de 4000 anos (DUTRA et al., 2016; CALIXTO, 2019). Com o passar dos anos e em decorrência dos avanços no âmbito das Ciências da Saúde, o interesse científico por medicamentos derivados dessa matriz tornou-se cada vez mais evidente (BADKE et al., 2011; DUTRA et al., 2016).

Historicamente, temos 2004 como um importante ano na legitimação da fitoterapia no Brasil (FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014). Neste ano a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) publicou quatro resoluções relacionadas a essa classe de medicamentos: a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 48/2004, que dispunha sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, a Resolução Especial (RE) nº 88/2004, que estabeleceu a lista de referências

bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos, a RE nº 89/2004, que estabeleceu a lista de registro simplificado de fitoterápicos e a RE nº 90/2004, que estabeleceu um guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos (BRASIL, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d).

Com interesse na continuidade no processo de reconhecimento formal desta prática terapêutica, em 2006, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) (PNPIC), através da Portaria do Ministério da Saúde GM/MS nº 971 e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), pelo Decreto nº 5.813/06 (BRASIL, 2006a, 2006b). Em 2008, o Ministério da Saúde do Brasil instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos dentro do SUS através da Portaria nº 2.960, de 09 de dezembro (BRASIL, 2008; NUNES et al., 2009; DE FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

Todas essas medidas foram tomadas com o intuito de beneficiar os setores envolvidos desde o do cultivo de plantas até a produção dos fitoterápicos, gerando emprego e renda. Outro ponto de favorecimento foi o incentivo à pesquisa e o desenvolvimento de tecnologia e inovações nas diversas etapas da cadeia produtiva de fitoterápicos, resultando na ampliação do arsenal terapêutico oferecidos pelo SUS aos usuários, com garantia da sua qualidade, segurança e eficácia. Além disso, foi uma medida que proporcionou a valorização da biodiversidade brasileira e do conhecimento popular (BRASIL, 2006b, 2008; NUNES et al., 2009; FIGUEREDO; GURGEL; GURGEL JUNIOR, 2014).

O mercado global anual de medicamentos vale cerca de 1,1 trilhão de dólares. Aproximadamente 35% desses medicamentos foram originados direta ou indiretamente de produtos naturais. Isso mostra que apesar da grande diversidade de compostos sintéticos existentes, os produtos naturais e suas estruturas derivadas continuam sendo elementos extremamente importantes das Farmacopeias e também um recurso constantemente aplicado nas empresas farmacêuticas globais (NGO et al., 2013; CALIXTO, 2019).

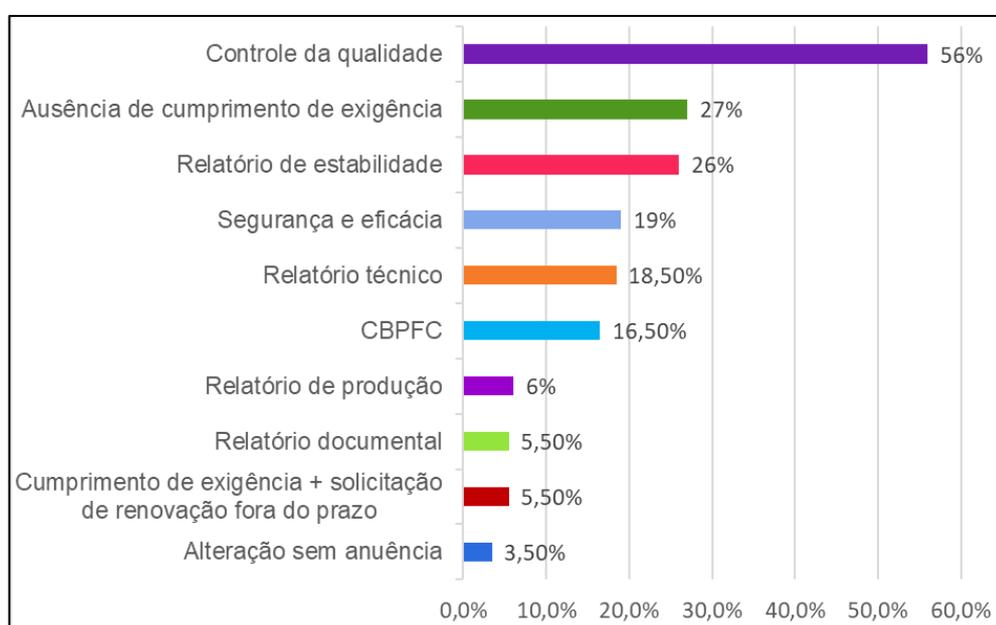
Tendo em vista o aproveitamento das espécies vegetais para fins terapêuticos, o Brasil é um país promissor devido a sua biodiversidade, definida por alguns estudiosos como a variedade e complexidade entre os organismos vivos, incluindo espécies, DNA, genes, proteoma, metaboloma e sua interação com seus sistemas ecológicos (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

O Brasil é o país com a maior biodiversidade do mundo, possuindo uma área de 8.511.996 km², na qual são distribuídos seis biomas terrestres (Floresta amazônica, Caatinga, Cerrado, Savana, Mata Atlântica, Pântano/Pantanal e Pampas) (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018), compreendendo mais de 45.000 espécies de plantas superiores, cerca de 20% do total existente no planeta (DUTRA et al., 2016).

Apesar da ampla diversidade de espécies nativas, o número de produtos fitoterápicos licenciados no Brasil ainda é pequeno quando comparado a outros países. Em 2016, por exemplo, 359 produtos fitoterápicos estavam registrados na Anvisa, mostrando uma redução no número de produtos registrados quando comparado aos dados referentes aos anos de 2008 e 2011, onde estavam documentos 512 e 382 fitoterápicos, respectivamente (CARVALHO et al., 2018).

A redução no número de fitoterápicos com registro na Anvisa pode ser explicada pela expressiva quantidade de produtos retirados do mercado. O estudo realizado por Perfeito, em 2012, mostrou que 50% dos medicamentos fitoterápicos, um total de 192 produtos, no período de 2008 a 2010, tiveram o pedido de renovação de registro indeferido, e as principais razões de indeferimento estão relacionadas à falta de suporte técnico e descumprimento de requisitos sanitários, como mostra a figura 2 (PERFEITO, 2012).

Figura 2 - Principais razões de indeferimento das solicitações de registro de medicamentos fitoterápicos.



Fonte: PERFEITO, 2012.

Hoje, observa-se a fitoterapia de forma mais consolidada e desempenhando um papel importante na assistência à saúde da população. No Brasil, tem-se disponíveis para população medicamentos fitoterápicos registrados para diversas indicações como Tamarine® para constipação, Seakalm® e Sintocalmy®, à base de *Passiflora incarnata L.*, como calmante, Fisioton® para quadros de cansaço e fadiga, Ginkomed®, indicado para distúrbios circulatórios e insuficiência vascular cerebral, Phitóss® e Abrilar®, à base de *Hedera helix L.*, para o tratamento de doenças broncopulmonares e até mesmo creme vaginal antimicrobiano e aerossol para dores musculares e inflamações como Kronel® e Acheflan®, respectivamente, mostrando que o estudo de plantas traz uma significância efetiva na saúde da população (DAVID; NASCIMENTO; DAVID, 2004; KLEIN et al., 2009).

Futuramente, é provável que os produtos naturais e os compostos a eles relacionados tornem-se ainda mais importantes para o desenvolvimento e aprimoramento de medicamentos, em razão dessa variedade de metabólitos secundários funcionalmente relevantes encontrados nas espécies vegetais (NGO et al., 2013)

2.3.1 *Thuja occidentalis* Linn

Thuja é um pequeno gênero botânico da família Cupressaceae, que compreende um grupo de cinco espécies: *Thuja occidentalis*, *T. plicata*, *T. koraiensis*, *T. standishii* (Gordon) Carr. e *T. sutchuenensis* Franch, das quais, as duas primeiras são endêmicas da América do Norte, enquanto as três restantes são características do leste asiático (LI; XIANG, 2005; NASER et al., 2005).

Dentre essas espécies, *T. occidentalis* Linn é uma conífera nativa do leste da América do Norte e conhecida nessa região como “árvore da vida” ou “cedro branco do norte” (STANGERLIN et al., 2008; TSIRI et al., 2009). Árvore monóica, de caule ereto e casca marrom alaranjada, que se torna marrom escura quando adulta, suas folhas são escamiformes e verde-escuras, com um verde mais brilhante na parte inferior, onde as glândulas ovais se localizam, contendo uma resina de odor característico, intenso, sabor picante, balsâmico e canforáceo (Figura 3). Possuem de 15 a 20 metros de altura e necessitam de solos profundos para desenvolver-se, com pH de 5,2 a 7.0 (NASER et al., 2005; STANGERLIN et al., 2008; TSIRI et al., 2009;

BRASIL, 2011). Quanto à disponibilidade de água, são bastante tolerantes, mostrando-se adaptáveis de solos secos a pantanosos (EDWARDS; DIXON, 1995).

No Brasil, *T. occidentalis* é popularmente conhecida como “cipreste” ou “tuia”, e tem seu cultivo voltado quase que exclusivamente para o âmbito ornamental, em projetos de paisagismo, assim como também ocorre na Europa (STANGERLIN et al., 2008; TSIRI et al., 2009).

Entretanto, diversos estudos com essa espécie mostram uma rica composição fitoquímica, havendo sido notada a presença de saponinas, fenóis, taninos, amins, mucilagens, compostos lactônicos, carotenos, óleo essencial, terpenos, triterpenos, cânfora e esteroides (CASTELLÓN et al., 2000; TSIRI et al., 2009). Açúcares redutores, polissacarídeos e minerais solúveis em água, ácido livre, agentes tânicos, cumarinas e flavonoides também foram identificados neste material vegetal (NASER et al., 2005; ALVES et al., 2014).

Figura 3 - Folha de *Thuja occidentalis* Linn.



Fonte: Dados da pesquisa

Dentre esses metabólitos, os flavonoides são um grupo de importância química e farmacológica para a *T. occidentalis* L. (FIGUEIRÉDO et al., 2014), sendo (+/-)-catequina, (-)-galocatequina, mearnsitrina, miricetina, procianidida B-3, prodelfinidina, quercetina, quercitrina, canferol e canferol-3-O- α -ramnosídeo (CASTELLÓN et al., 2000; NASER et al., 2005), mearusitrina, bilobetina e o biflavonóide amentoflavona,

os compostos flavonoídicos evidenciados na espécie (GRUENWALD; BRENDLER; JAENICKE, 2000).

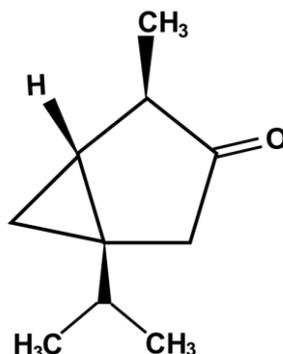
A presença dos diferentes metabólitos secundários é responsável pelas atribuições farmacológicas descritas na literatura. Na medicina popular, há relatos da utilização dessa planta medicinal no tratamento de catarro brônquico, cistite, psoríase, carcinomas uterinos, amenorreia e reumatismo (CHANG et al., 2000). Já seu potencial imunestimulante e antiviral foi observado em vários modelos de testes *in vitro* e *in vivo* (NASER et al., 2005). Propriedades antioxidantes hepatoprotetora, antiulcerogênica, anticâncer e antidiabéticas também foram relatadas (ALVES et al., 2014; JASUJA et al., 2015).

A tintura de *T. occidentalis* e suas diluições demonstraram aplicação no tratamento de infecções agudas e crônicas do trato respiratório superior, no tratamento de verrugas, papilomas e condilomas, até mesmo aqueles provocados pelo papilomavírus humano (HPV). Já o extrato metanólico mostrou ótimo potencial contra cepas de *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Shigella flexenari*, *Yersinia aldovae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de bons resultados contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Aspergillus parasiticus*, *Trichophyton rubrum* e *Yersinia almenova* (JAHAN et al., 2010; JASUJA et al., 2015). Nos trabalhos realizados por TSIRI e colaboradores (2009) e por ALVES (2014), a atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis* foi observada.

Um estudo mostrou que a ingestão da planta fresca não é adequada, podendo levar a quadros de intoxicação. Os principais sintomas são vômitos, dor no estômago, diarreia e, em quadros mais graves, pode-se estender a convulsões crônicas e toxicidade hepática e renal (NASER et al., 2005). Esses efeitos são relatados devido à alta concentração de tujona nas folhas frescas (AKKOL et al., 2015).

A pesquisa realizada com o óleo essencial retirado das folhas evidenciou a presença significativa de cetonas, principalmente alfa-tujona, beta-tujona e fenchona (TSIRI et al., 2009). Dentre estes, a alfa-tujona, uma cetona monoterpênica (Figura 4), destacou-se por ter sido o composto majoritário, chegando a um percentual de 62,12%. Por esse motivo, seu uso deve ser moderado (NASER et al., 2005; ALVES et al., 2014).

Figura 4 - Estrutura química da alfa-tujona.



Fonte: Autoria própria.

Apesar disso, o óleo essencial desse material vegetal comprovou benefício terapêutico em tratamentos da síndrome do ovário policístico (SOP) e bom potencial antitumoral (KHUDA-BUKHSH et al., 2011; AKKOL et al., 2015). Já o estudo de toxicidade aguda, feito a partir do extrato etanólico de *T. occidentalis* L., mostrou bons resultados. Com uma DL_{50} de 2.312 mg/Kg de peso do animal, o extrato foi considerado de baixa toxicidade e enquadrado na categoria 5, segundo o *Globally Harmonized System* (GHS) e também não apresentou efeito abortivo direto ou indireto (ALVES, 2014).

2.4 FILMES MUCOADESIVOS COMO FORMA FARMACÊUTICA

2.4.1 Cavidade oral

A cavidade oral tem sido proposta como um local potencial de administração medicamentosa, por ser facilmente acessível, e pelo fato de sua estrutura permitir uma terapia local ou sistêmica. É altamente vascularizada e tem fluxo sanguíneo relativamente rápido (2,4 mL/min/cm²) (RUSSO et al., 2016). Além disso, a mucosa oral é considerada menos suscetível a danos ou irritações potenciais relacionadas a medicamentos ou excipientes possuindo uma rápida renovação celular (5 a 6 dias) (PIZZOL, 2009; PATEL; LIU; BROWN, 2011; MEHER et al., 2013).

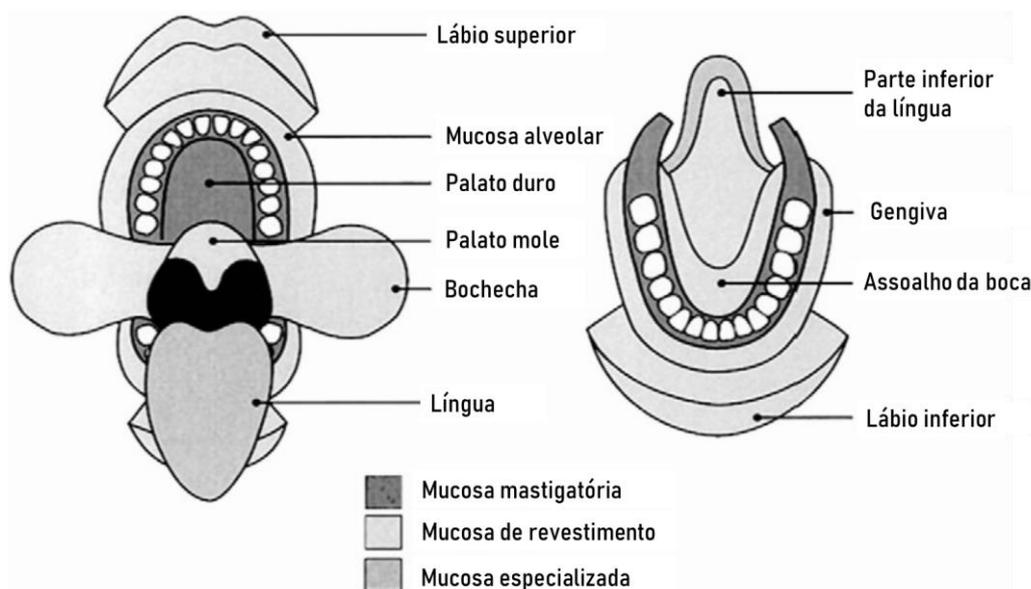
Contudo, a permeabilidade da região é moderada, devido a sua estrutura estratificada, o que pode dificultar a entrega sistêmica de fármacos (SOUSA, 2018). Estudos de permeação bucal indicam que o mecanismo de absorção predominante é

a difusão passiva do fármaco, através das membranas lipídicas (PATEL; LIU; BROWN, 2011).

Três tipos de mucosa podem ser encontradas na boca (Figura 5): a mucosa mastigatória, encontrada no palato duro e gengiva; a mucosa especializada, presente na superfície dorsal da língua e a mucosa de revestimento, recobrendo o assoalho bucal, ventre de língua, palato mole e superfície jugal e compondo aproximadamente 60% da área total da superfície oral de um ser humano adulto (PATEL; LIU; BROWN, 2011; AGUIAR, 2016; SOUSA, 2018).

A mucosa oral apresenta função de proteção, sensação, secreção e é adaptada ao ambiente úmido da boca, causado pela presença de uma camada de muco (AGUIAR, 2016). Esse muco tem um aspecto viscoso e heterogêneo e é composto por mucinas, uma glicoproteína responsável por aferir consistência de gel, por lipídios, hidratos de carbono, sais inorgânicos e água. Essa última representa mais de 95% do total (PEREIRINHA; FIGUEIRAS, 2014; FAVACHO, 2018).

Figura 5 - Representação esquemática das diferentes mucosas orais.



Fonte: Adaptado de SQUIER; KREMER, 2001.

2.4.2 Mucoadesão

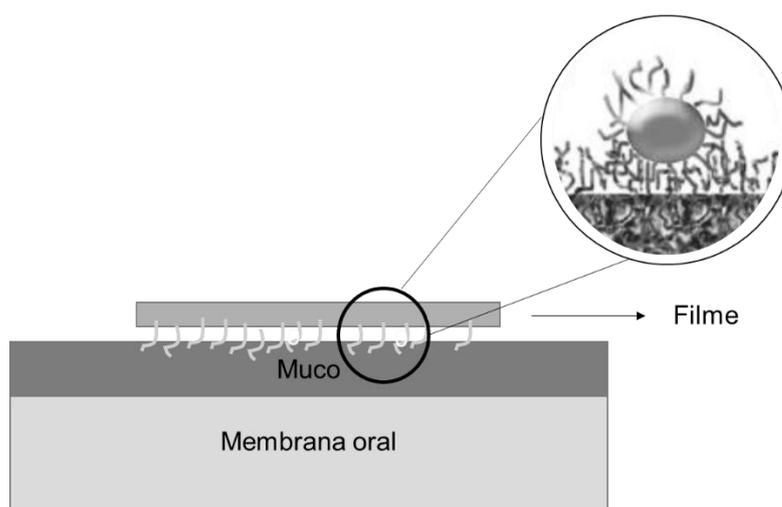
A mucoadesão está representada esquematicamente na figura 6, e é um termo empregado para descrever a interação que ocorre entre dois materiais, onde um deles

é uma superfície biológica (AGUIAR, 2016). No caso dos filmes mucoadesivos, a interação ocorre entre a superfície do polímero constituinte com as mucinas presentes no muco oral (SOUSA, 2018).

Para uma melhor elucidação, geralmente divide-se o mecanismo de mucoadesão em dois estágios: contato e consolidação. O primeiro caracteriza-se pelo estabelecimento de um contato permanente entre o polímero e a camada de muco. Ocorre a transferência de moléculas de água do muco para o polímero induzindo sua adesão a mucosa. Já o estágio de consolidação é quando interações físico-químicas (ligações iônicas, de Van der Waals, de hidrogênio e hidrofóbicas) são estabelecidas entre a malha polimérica e o muco, o que fortalece a ligação bioadesiva, conduzindo a uma adesão prolongada (TARDELLI, 2010; COUTO, 2015; AGUIAR, 2016; SOUSA, 2018).

Certos aspectos fisiológicos da cavidade oral também desempenham papéis significativos nesse processo, incluindo pH, volume de fluido, atividade enzimática e permeabilidade da mucosa oral (PATEL; LIU; BROWN, 2011).

Figura 6 - Interação entre a mucina presente na mucosa oral e os polímeros constituintes do filme mucoadesivo.



Fonte: Adaptado de TARDELLI, 2010.

2.4.3 Filmes mucoadesivos

As preparações mucoadesivas são amplamente utilizadas para administrar medicamentos na cavidade bucal. Há registro de estudos com adesivos, filmes, géis, pomadas e até mesmo comprimidos como formas de dosagens bioadesivas para a região bucal (KRAISIT et al., 2018).

Esses sistemas mucoadesivos têm como vantagens a prevenção do efeito de primeira passagem, necessitando de uma dosagem muito menor quando comparada a formas de administração oral, por evitar a degradação gástrica do medicamento. Além de fornecer um início de ação mais rápido e melhor biodisponibilidade. Além disso, não necessitam de água para administração (RUSSO et al., 2016; LI et al., 2017; FAVACHO, 2018).

São formas farmacêuticas especialmente interessantes para populações pediátricas e geriátricas, que comumente apresentam quadros de disfagia ou que receiam a asfixia (GARSUCH; BREITKREUTZ, 2010; BARROCO, 2013; ELEFTHERIADIS et al., 2019).

Os filmes, em particular, são uma alternativa farmacêutica favorável devido a sua flexibilidade, espessura e por possuírem dimensões reduzidas, geralmente variando de 2 a 10 cm², espessura inferior a 1 mm e formato variado (MARTO; SALGADO; ALMEIDA, 2011; BARROCO, 2013; BODINI, 2015). É uma forma cômoda, que permite fácil retirada em casos de emergência e maior precisão de dose quando comparados a outros sistemas bucais de administração como géis, cremes ou pomadas (PIZZOL, 2009; PATEL; LIU; BROWN, 2011; KRAISIT et al., 2018).

Os pontos cruciais para essa forma farmacêutica são suas propriedades de umedecimento, desintegração, efeito da mucoadesão e a liberação do fármaco (BORGES et al., 2015). São formados por matrizes poliméricas complexas, que pode ser originada a partir de vários componentes, de acordo com a entrega desejada para o fármaco (ALOPAEUS et al., 2020).

Segundo TARDELLI (2010) os polímeros mais empregados nos Estados Unidos da América são as gomas de amido, carboximetilcelulose, carragena, locusta, pululana, xantana e konjac.

Não se deve confundir filmes orodispersíveis (ODFs) com filmes mucoadesivos (MBFs). A Farmacopeia Europeia (Ph.Eur. 9^a ed, 2017) os diferencia da seguinte forma: o primeiro sendo destinado à rápida desintegração e deglutição, o segundo

como uma formulação de liberação prolongada de ação local ou sistêmica (BORGES et al., 2015; SPEER; PREIS; BREITKREUTZ, 2019). Este ainda pode desintegrar-se com o tempo ou não, onde seria necessária a remoção manual (ALOPAEUS et al., 2020).

Também chamados de películas, os filmes foram introduzidos no mercado no ano de 2001 pela Pfizer®, com a designação Thin-Strips® (Listerine PocketPaks) fabricados para o combate ao mau hálito e gengivites (MARTO; SALGADO; ALMEIDA, 2011). A partir disto, começou-se a pesquisar a utilização desta forma farmacêutica para diferentes finalidades.

Nos estudos de LI e colaboradores (2017) e de SOUSA (2018), foram desenvolvidos filmes analgésicos locais à base de tramadol e anestésicos locais utilizando lidocaína e prilocaína como agente ativo, respectivamente. Registros de boas respostas para filmes orais foram encontrados em preparações contra náuseas e vômitos com metoclopramida (ALMEIDA; LOPES; CHAUD, 2012), para o tratamento da hipertensão, utilizando o propranolol, e antifúngico, a partir de nitrato de miconazol (ABRUZZO et al., 2012; TEJADA et al., 2017; KRAISIT et al., 2018). Substâncias como: naproxeno, salbutamol e progesterona também foram formuladas como filmes mucoadesivos e mostraram-se terapeuticamente satisfatórias (MEHER et al., 2013).

Formulações utilizando-se das propriedades farmacológicas de extratos vegetais também foram observadas, como foi o caso de *Curcuma longa* (açafrão), utilizada para a obtenção de efeito anticândida e do extrato de *Cordia verbenacea* (erva baleeira) pela sua capacidade anti-inflamatória (BODINI, 2015).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

A identificação da espécie foi previamente realizada pela pesquisadora e curadora Dra. Rita de Cássia Araújo Pereira e a exsicata depositada no Herbário Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), sob o nº 87.752 (ALVES, 2014).

Foram coletadas, no mês de agosto/2018, as folhas de *Thuja occidentalis*, obtidas a partir de mudas cultivadas no município do Cabo de Santo Agostinho - PE (8°29'86,07"S e 35°06'45,29"W). Após a coleta, o material vegetal fresco foi lavado com água destilada, aspergido com álcool etílico a 70 % (v/v) (Santa Cruz®) e seco em estufa de ar circulante (EthikTechnology®, 420/3D) por 120 horas (5 dias) à temperatura de 40 °C. O material seco obtido foi triturado em moinho de facas (SL-31 Solab®), obtendo-se um pó seco que foi acondicionado em recipientes de vidro vedado e sob ausência de luz. O material vegetal foi tratado de acordo com trabalho prévio com *T. occidentalis* (ALVES, 2014).

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Thuja occidentalis*

Para preparação dos extratos, utilizou-se a planta seca e triturada na proporção de 10 % (p/v). Como líquido extrator, foi empregada uma solução hidroalcoólica a 70 % (Santa Cruz®). O processo de digestão foi realizado sob aquecimento a 40 °C e agitação mecânica a 250 rpm por 60 minutos. Após a digestão, o extrato obtido foi filtrado em algodão e armazenado em frasco âmbar até o momento da utilização (ALVES, 2014)

3.2.1 Controles de qualidade físico-químicos do extrato etanólico a base de *T. occidentalis*

3.2.1.1 Determinação do pH

O pH das formulações foi verificado utilizando um pHmetro digital (Micronal®) previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0, em triplicata, seguindo a metodologia da Farmacopeia Brasileira 6ª ed (BRASIL, 2019).

3.2.1.2 Determinação da densidade relativa

Para determinação da densidade relativa, foi utilizado um picnômetro limpo e seco com capacidade para 25 mL, previamente tarado, que foi preenchido com o líquido padrão (água destilada a 20°C) e pesado em balança analítica (Shimadzu®) mantendo o cuidado durante o manuseio de tocar na vidaria apenas com o papel absorvente e eliminando as bolhas presentes no líquido. Em seguida, o picnômetro foi lavado com a amostra na mesma temperatura e pesado, preocupando-se em o secar externamente sem tocar na parte superior, esse procedimento ocorreu sempre entre a troca de líquidos para pesagem seguinte. A relação entre o peso do padrão e da amostra, em um volume fixo, forneceu o valor da densidade relativa do extrato através das fórmulas 1 e 2 (BRASIL, 2019).

Fórmula 1:

$$d_{20}^{20} = \frac{m_{\text{extrato}}}{m_{\text{água}}}$$

Em que:

m_{extrato} = massa do extrato que ocupa o volume V do picnômetro;

$m_{\text{água}}$ = massa de água pura que ocupa o mesmo volume V do picnômetro.

Fórmula 2:

$$p_{20} = 0,99820 \cdot d_{20}^{20} + 0,0012$$

3.2.1.3 Determinação do grau alcoólico

O grau alcoólico foi determinado utilizando-se alcoômetro centesimal. O extrato a 20°C foi colocado em uma proveta de tamanho suficiente para que o alcoômetro não tocasse no fundo. O alcoômetro foi imerso, e quando atingiu uma posição de equilíbrio sua graduação foi verificada, determinando o teor alcoólico do extrato em grau Gay-Lussac (°G.L.) (BRASIL, 2019).

3.2.1.4 Determinação do resíduo seco

Em pesa-filtros previamente tarados, foram medidos 2 mL do extrato etanólicos e, em seguida, evaporadas em banho-maria até a secura. Os resíduos foram colocados em estufa de secagem (Ethik®) à 105 ± 2 °C por 3 horas, resfriados em dessecador, em presença de gel de sílica anidro, e pesados. O resultado foi expresso em relação a 100 mL do extrato, obtendo-se o percentual massa/volume referente à média de três determinações (BRASIL, 2019).

3.2.1.5 Determinação do perfil térmico

Foi utilizada a técnica de termogravimetria (TG), utilizando-se uma termobalança, modelo DTG-60H (Shimadzu®). As amostras foram pesadas ($5,0 \text{ mg} \pm 0,05$) em porta-amostras de platina, e a análise foi realizada com a razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, sob uma faixa de temperatura de 20 a 600°C , em atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Antes do início dos ensaios, foi realizado o branco com o porta-amostra de platina vazio para avaliar a linha de base do sistema. E a calibração do equipamento foi realizada com o padrão oxalato de cálcio (adaptado de SILVA, 2019)

3.3 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV

Teve-se por objetivo desenvolver um método, por diluição direta com AlCl_3 , para quantificação de flavonoides totais expressos em quercetina para o extrato etanólico a 70% das folhas de *T. occidentalis*.

3.3.1 Matérias-primas

Foram utilizados: cloreto de alumínio Sigma-Aldrich® (Lote:STBF3916V), metanol Química Moderna® (Lote:08660) e como padrão, quercetina Sigma-Aldrich® (Lote:STBD6011V).

3.3.2 Desenvolvimento do método analítico

No desenvolvimento do método, foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração ideal da solução extrativa, determinação do comprimento de onda de leitura, volume necessário da solução de cloreto de alumínio a 2,5% (m/v) e determinação da curva-padrão (adaptado de PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012; LYRA, 2013 e SILVA, 2019)

3.3.2.1 Obtenção da solução extrativa e solução mãe

A solução extrativa foi obtida segundo o item 3.2 e diluídas numa concentração de 1mg/mL (solução mãe) de acordo com os dados do resíduo seco do extrato, previamente realizado.

3.3.2.2 Seleção do comprimento de onda e diluição das amostras

Uma série de amostras, diluídas a partir da solução mãe (1mg/mL) foram submetidas à varredura em espectrofotômetro (UV/Vis-mini-1240, Shimadzu®) na faixa de 200 a 600 nm, após 30 min da adição de 2 mL de solução metanólica de $AlCl_3$ (2,5%, m/v), para identificação da diluição e do comprimento de onda que apresentassem o valor de absorvância mais adequado para o método. Como branco, foi utilizada uma solução de compensação preparada da mesma forma que a amostra, sem adição de $AlCl_3$.

3.3.2.3 Determinação do tempo de leitura

Foram realizadas leituras das amostras a 409 nm no tempo 0 de reação e depois nos intervalos 5, 15, 30, 45 e 60 minutos após adição da solução metanólica de $AlCl_3$. Os balões, contendo as amostras, foram envoltos em papel alumínio, durante todo o procedimento, para evitar interferências do fator luminosidade. A análise foi realizada em triplicata.

3.3.2.4 Avaliação do volume da solução de cloreto de alumínio

Para a determinar o volume adequado da solução de cloreto de alumínio 2,5% (m/v), foi verificado o perfil de variação das absorbâncias, após adição dos volumes 0,05 mL, 0,1 mL, 0,25 mL, 0,5 mL, 1 mL e 2,0 mL da solução na faixa de 200 a 600 nm. O extrato sem AlCl_3 também foi observado. O estudo foi realizado em triplicata.

3.3.2.5 Desenvolvimento da curva-padrão

Para escolha dos pontos da curva-padrão, foi feita uma curva-teste com 10 pontos nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 20,0 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, a fim de avaliar o melhor intervalo de concentrações, baseada na concentração da amostra. Na curva teste foram adicionados 2mL de solução metanólica de AlCl_3 (2,5%, m/v) e completados para 10 mL com água destilada. As soluções foram armazenadas ao abrigo de luz por 30 minutos, e posteriormente foi feita a leitura em espectrofotômetro (409 nm).

3.3.3 Validação dos procedimentos analíticos

A validação do método foi realizada de acordo com o que é estabelecido pela RDC nº166 de 2017 (BRASIL, 2017).

3.3.3.1 Seletividade

Esse parâmetro foi verificado através da sobreposição dos espectros das amostras obtidas, a partir da solução extrativa com e sem adição de AlCl_3 (2,5% m/v) e do padrão quercetina com AlCl_3 , obtidos no intervalo de comprimento de onda compreendido de 200 a 600 nm.

3.3.3.2 Linearidade

A linearidade da resposta espectrofotométrica para o procedimento em estudo foi verificada a partir da análise de três curvas autênticas, construídas com amostras da solução extrativa em cinco níveis de concentração (0,100; 0,125; 0,150; 0,175 e

0,200 mg/mL), compreendendo o intervalo de 80% a 120%. As curvas foram construídas empregando os valores médios das absorvâncias em função da concentração. Os resultados obtidos foram tratados estatisticamente, através do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, a fim de definir o coeficiente de determinação (R^2), adotando $R^2 > 0,99$ como valor mínimo para aceitação.

3.3.3.3 Robustez

O ensaio para determinação da robustez do método foi realizado a partir da variação dos seguintes parâmetros: volume da solução metanólica de $AlCl_3$ (90, 100 e 110%), tempo de leitura (25, 30 e 35 min) e luminosidade (ausência e presença de luz). As amostras foram preparadas em triplicata.

3.3.3.4 Precisão

A precisão foi avaliada por meio de dois níveis: repetibilidade (precisão intracorrída) e precisão intermediária (precisão intercorrídas). Para calcular a repetibilidade, em um único dia, um analista determinou a concentração de seis amostras a 100% da concentração teste, individualmente preparada. Para análise da precisão intermediária, um outro analista, no dia posterior ao ensaio de precisão avaliou a concentração de seis amostras a 100% da concentração teste, também preparadas individualmente.

3.3.3.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada por ensaios de recuperação, através da adição de quantidades conhecidas da solução padrão de quercetina (3,0; 6,0 e 9,0 $\mu\text{g/mL}$) equivalente a 50, 100 e 150% da concentração a amostras preparadas na concentração estabelecida como 100%. A análise foi realizada em triplicata e os valores de recuperação (%) foram determinados através da fórmula 3.

Fórmula 3: $Recuperação\% = Ce/Ct \times 100$

Onde: C_e = Concentração média experimental

C_t = Concentração teórica

3.3.4 Determinação do teor de flavonoides totais

Uma alíquota de 1,5 mL da solução mãe do extrato, preparada com água destilada na concentração de 1,0 mg/mL foi transferida para um balão de 10 mL. Posteriormente, foi adicionado 0,100 mL de uma solução metanólica de cloreto de alumínio é 2,5%, e o volume do balão foi completado com água destilada. As amostras permaneceram ao abrigo de luz por 30 minutos, à temperatura ambiente. As absorvâncias das amostras foram lidas no comprimento de onda de 409 nm. Uma solução de compensação sem a presença da solução de $AlCl_3$ (2,5%) foi utilizada como branco. As amostras foram preparadas em triplicata.

A curva de calibração foi preparada com os seguintes pontos: 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 9,0 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina, preparados da mesma forma que as amostras. O teor de flavonoides totais foi calculado a partir da equação da reta e expresso em mg EQ%/g de extrato.

3.4 SECAGEM DO EXTRATO ETANÓLICO

O extrato foi seco por evaporação de solvente e o manitol (Nuclear®) foi utilizado como adjuvante de secagem. Realizou-se 10 ciclos de secagem. O extrato etanólico foi incorporado ao manitol na proporção 1:1 (100 mL de extrato para 100 g de manitol) em batedeira planetária (Arno®), por 3 minutos. Após a incorporação, o material foi colocado em uma estufa de circulação de ar (EthikTechnology®, 420/3D) a $40 \pm 5^\circ\text{C}$, por 2h, sob pressão atmosférica. O processo de adição do extrato etanólico foi repetido 10 vezes para obtenção de um material final na proporção 10:1 de extrato:manitol. Na última etapa, o material permaneceu por 4h na estufa, para completa remoção do solvente. O produto formado foi acondicionado à temperatura ambiente e sob abrigo de luz.

3.4.1 Controles de qualidade físico-químicos do extrato seco à base de *T. occidentalis*.

3.4.1.1 Perda por dessecação (método gravimétrico)

Pesaram-se aproximadamente 2 g da amostra, em um pesa-filtro previamente dessecado por 30 minutos a 105 ± 2 °C, e resfriado à temperatura ambiente em dessecador. A amostra foi distribuída de maneira uniforme pelo pesa-filtro e colocada pra secar em estufa (Ethik®) destampada, com a tampa também na câmara de secagem. Após 2 horas a amostra foi resfriada em dessecador e pesada. O processo foi repetido até peso constante, adicionando-se 1h a cada novo ciclo. Ao final, a porcentagem de perda por dessecação foi calculada através da fórmula 4 (BRASIL, 2019).

Fórmula 4:
$$\% \text{ perda por dessecação} = \frac{P_u - P_s}{P_a} \times 100$$

Onde:

Pa = peso da amostra;

Pu = peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação;

Ps = peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação.

3.4.1.2 Determinação granulométrica

Para determinação da distribuição granulométrica, pesaram-se cerca de 10 g do extrato seco, submetido à vibração (Agitador de peneiras Bertel®) por 15 min em tamises com as seguintes malhas: 30, 40, 60, 100, 200 de acordo com a classificação ABNT, correspondentes às aberturas das malhas de 600, 425, 250, 150 e 75 µm, respectivamente. Através das curvas de passagem e retenção, calculou-se o tamanho médio de partículas (BRASIL, 2019).

3.4.1.3 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

O espectro de absorção na região do infravermelho médio foi obtido utilizando o equipamento PerkinElmer® (Spectrum 400), com dispositivo de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de selênio. A análise foi realizada por varredura das amostras na região compreendida entre 4000 a 650 cm^{-1} .

3.4.1.4 Determinação do perfil térmico do extrato seco

Foi realizado conforme descrito no item 3.2.1.5

3.5 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO E SECO DE *Thuja occidentalis*.

Para avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas cepas de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, todas recém isoladas e provenientes de amostras clínicas de pacientes do Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco.

Os testes de sensibilidade antifúngica *in vitro* foram realizados utilizando o meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, pH $7,0 \pm 0,1$, com ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS, 0,165 mol/L). O meio de cultura foi esterilizado em membranas de 0,22 μm . Os extratos fluido e seco foram diluídos em água ultrapura a uma concentração inicial de 1.024 $\mu\text{g/mL}$ sendo diluída de forma seriada nas concentrações de 512 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ e 2 $\mu\text{g/mL}$.

Para o preparo do inóculo as leveduras foram mantidas em meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) e incubadas a 35 °C. As suspensões dos isolados foram preparadas em solução salina, e sua densidade ajustada de acordo com a escala 0,5 de MacFarland em 90% da transmitância utilizando um espectrofotômetro (Genesys® 10s UV-Vis) a 530 nm. O volume do inóculo foi ajustado para 5,0 mL de solução salina esterilizada e posteriormente diluído em RPMI 1640 para uma concentração de $2-5 \times 10^3$ céls/mL.

Para os testes de sensibilidade, foram utilizadas microplacas de fundo chato com 96 poços. O inóculo foi adicionado aos poços com as frações a serem testadas, sendo a penúltima e última coluna da placa reservadas para os controles positivos +(meio contaminado com a cepa) e negativos (meio puro). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada em relação ao poço controle. O teste foi realizado em duplicata (BRASIL, 2003).

3.6 OBTENÇÃO DE FILMES MUCOADESIVOS CONTENDO EXTRATO DE *Thuja occidentalis*.

3.6.1 Desenvolvimento das formulações base dos filmes mucoadesivos

Por ser o principal componente do sistema, foi feita uma planificação qualitativa testando 4 (quatro) diferentes polímeros como elemento mucoadesivo da formulação, sendo eles: Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), Goma de celulose (Cekol®) e Carboximetilcelulose (CMC) e goma guar. Como plastificante e copolímero, foi utilizado o sorbitol e o amido pré-gelatinizado (Starch 1500®), respectivamente. Preparou-se empiricamente algumas formulações os componentes básicos para a formação do filme (polímero mucoadesivo, plastificante e veículo) a fim de determinar a melhores concentrações, chegando nos lotes observados na tabela 1.

Todos os filmes foram preparados por dispersão do polímero em água destilada pré-aquecida à $\pm 80^{\circ}\text{C}$ e sob agitação mecânica constante. A adição dos polímeros foi gradativa para evitar a formação de grumos do material. O material permaneceu em agitação, até completa dispersão do material. Adicionou-se o amido pré-gelatinizado na formulação e, quando totalmente homogênea, esta foi resfriada a 50°C , onde o agente plastificante sorbitol, já pré-solubilizado em água, foi adicionado e homogeneizado. O volume final de 100 mL foi completado com água destilada (adaptado de BODINI, 2015).

Os filmes foram preparados em formas de plástico de 4,4 mm x 2,2 mm, onde foram adicionados 2 mL da formulação. O material foi colocado em estufa de circulação de ar (EthikTechnology, 420/3D) a 40°C , até sua completa secura.

O esquema ilustrativo do método de obtenção dos filmes-base está descrito na figura 7.

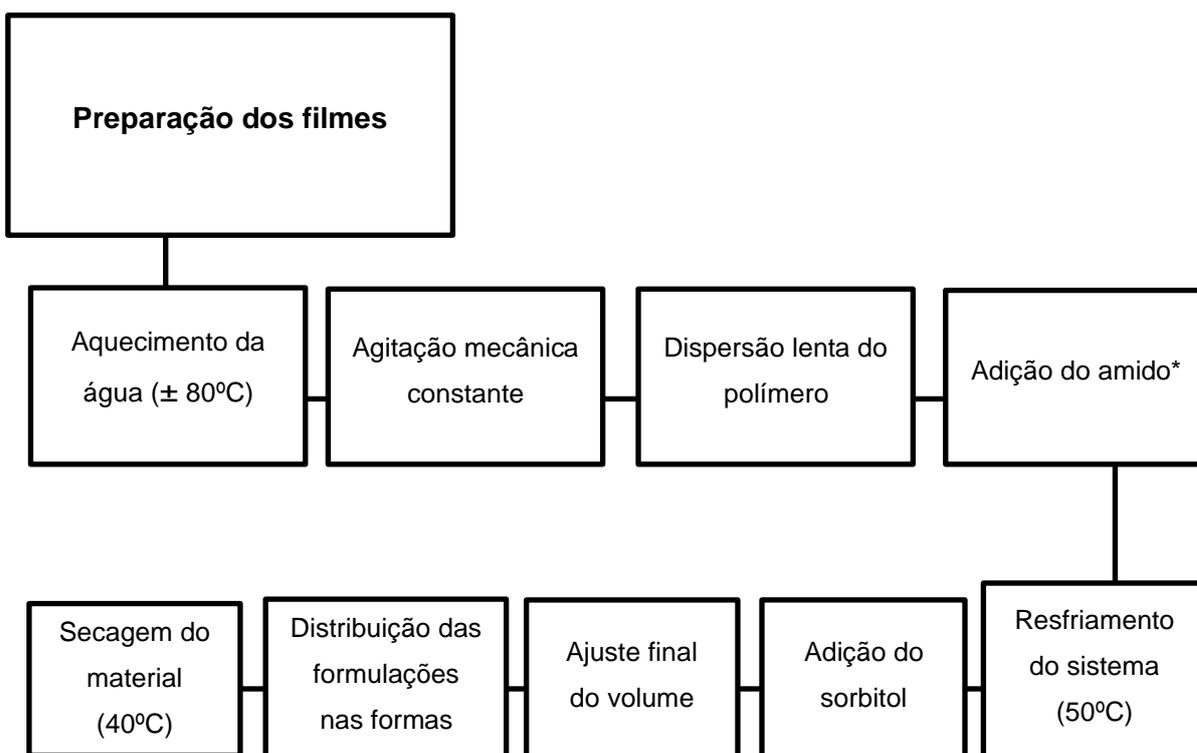
Tabela 1 - Lotes de bancada das formulações base dos filmes orais desenvolvidos.

FORMULAÇÃO	LB1 (%)	LB2 (%)	LB3 (%)	LB4 (%)	FUNÇÃO
HPMC	2,0	-	-	-	Polímeros mucoadesivo
Goma de celulose	-	2,4	-	-	
Goma Guar	-	-	0,5	-	
CMC	-	-	-	0,8	
Amido pré-gelatinizado	-	0,6	2,4	2,4	Copolímero
Sorbitol	5,0	5,0	3,0	5,0	Plastificante
Água destilada	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	Veículo
Total (%)	100	100	100	100	

Legenda: LB= Lote de bancada; HPMC= Hidroxipropilmetilcelulose; CMC= Carboximetilcelulose; q.s.p= Quantidade suficiente para

Fonte: Dados da pesquisa

Figura 7 - Esquema do processo de obtenção dos filmes à base de HPMC, Goma de celulose, CMC e Goma guar.



*Apenas nas formulações de CMC, goma de celulose e goma guar

Fonte: Dados da pesquisa.

3.6.2 Formulação final do filme mucoadesivo

Após estabelecer os melhores lotes base para cada um dos polímeros, eles foram preparados da mesma forma do item 3.6.1, porém com a adição dos seguintes componentes: metilparabeno como conservante, ácido cítrico como estimulante de saliva, xilitol como edulcorante e do extrato à base de *T. occidentalis* (DIXIT; PUTHLI, 2009; ALMEIDA; LOPES; CHAUD, 2012). Com o extrato seco foram preparados filmes com 5% e com o extrato etanólico os filmes foram produzidos com 10% (Tabela 2). Adicionaram-se 2 mL dessas formulações nas formas dos filmes e o material foi seco em estufa de circulação de ar nas mesmas condições descritas também no item 3.6.1.

Tabela 2 - Formulações finais dos filmes mucoadesivos

FORMULAÇÃO	LB5 (%)	LB6 (%)	LB7 (%)	LB8 (%)	LB9 (%)	LB10 (%)	FUNÇÃO
<i>Extrato seco de Thuja occidentalis</i>	5,0	5,0	5,0	-	-	-	Insumo
<i>Extrato etanólico de Thuja occidentalis</i>	-	-	-	10,0	10,0	10,0	Farmacêutico
<i>HPMC</i>	2,0	-	-	2,0	-	-	Polímeros mucoadesivos
<i>Goma de celulose</i>	-	2,4	-	-	-	-	
<i>Goma Guar</i>	-	-	0,5	-	0,5	-	
<i>CMC</i>	-	-	-	-	-	0,8	
<i>Amido pré-gelatinizado</i>	-	0,6	2,4	-	2,4	2,4	Copolímero
<i>Ácido cítrico</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Estimulante de saliva
<i>Xilitol</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Edulcorante
<i>Metilparabeno</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Conservante
<i>Sorbitol</i>	5,0	5,0	3,0	5,0	3,0	5,0	Plastificante e edulcorante
<i>Água destilada</i>	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	Veículo
Total (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	

Legenda: LB= Lote de bancada; HPMC= Hidroxipropilmetilcelulose; CMC= Carboximetilcelulose; q.s.p= Quantidade suficiente para

Fonte: Dados da pesquisa

Após o preparo de todos os lotes acima, foi escolhido o melhor lote a partir do extrato seco e o melhor lote a partir do extrato etanólico para dar continuidade ao estudo, a partir de uma variação quantitativa no excipiente mucoadesivo (Tabela 3), obtendo os lotes que são mostrados na tabela 4.

Tabela 3 - Níveis de variáveis do planejamento quantitativo do polímero mucoadesivo da formulação

Níveis	Goma de cel. (%)	CMC (%)
-1 (Inferior)	1,8	0,6
0 (Central)	2,4	0,8
+1 (Superior)	3,0	1,0

Legenda: Goma de cel = Goma de celulose; CMC= Carboximetilcelulose

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 4 – Lotes de bancada obtidos a partir da planificação quantitativa dos polímeros mucoadesivos

FORMULAÇÃO	LB11 (%)	LB6 (%)	LB12 (%)	LB13 (%)	LB10 (%)	LB14 (%)	FUNÇÃO
<i>Extrato seco de Thuja occidentalis</i>	5,0	5,0	5,0	-	-	-	Insumo
<i>Extrato etanólico de Thuja occidentalis</i>	-	-	-	10,0	10,0	10,0	Farmacêutico
Goma de celulose	1,8	2,4	3,0	-	-	-	Polímero
CMC	-	-	-	0,6	0,8	1,0	Mucoadesivo
<i>Amido pré-gelatinizado</i>	0,6	0,6	0,6	2,4	2,4	2,4	Copolímero
<i>Ácido cítrico</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Estimulante de saliva
<i>Xilitol</i>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Edulcorante
<i>Metilparabeno</i>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Conservante
<i>Sorbitol</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	Plastificante e edulcorante
<i>Água destilada</i>	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	q.s.p	Veículo
Total (%)	100	100	100	100	100	100	

Legenda: LB= Lote de bancada; CMC= Carboximetilcelulose; q.s.p= Quantidade suficiente para

Fonte: Dados da pesquisa.

Esses lotes foram avaliados de acordo com os controles de qualidade físico-químicos indicados para a forma farmacêutica.

3.6.3 Controles de qualidade dos filmes mucoadesivos

3.6.3.1 Aspecto visual

Todos os filmes foram inspecionados macroscopicamente quanto a sua uniformidade, observando presença de manchas, bolhas e quanto a sua textura (COUTO, 2015)

3.6.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com auxílio de um estereoscópio, os filmes foram cortados de forma transversal e longitudinal. Foram dispostos na superfície da fita de carbono sobre um Stub, suporte de alumínio, e levadas ao Sputter Coater (Denton Vacuum Desk IV, Moorestown, USA) para metalização com ouro carregado por argônio em alta pressão. Após a metalização, o material foi analisado no microscópio eletrônico de varredura JSM 6390LV (Jeol LTD, Japão) e as amostras representativas foram analisadas utilizando-se uma velocidade de aceleração do feixe de 10 kV para obtenção das eletromicrografias.

3.6.3.3 Espessura dos filmes orais

A espessura do filme foi determinada usando um paquímetro Digital Caliper® (0-150 mm). Cada filme foi medido em cinco posições, no centro e em suas quatro pontas e calculado o valor médio. A medição foi realizada em cinco filmes aleatórios, onde calculou-se média, variância e desvio-padrão (GARSUCH; BREITKREUTZ, 2009).

3.6.3.3 Uniformidade de peso

A uniformidade do peso dos filmes foi testada pesando-se cinco filmes aleatórios individualmente em balança analítica eletrônica Bioprecisa[®], modelo FA2104N, sendo calculado o peso médio, desvio-padrão e variância (LI et al., 2017).

3.6.3.4 Tempo de desintegração

Por não existir um método oficial para determinação do tempo de desintegração de filmes de mucoadesivos, optou-se por adaptar o método descrito na Farmacopeia Brasileira 6^a ed. O teste foi realizado em desintegrador Nova Ética[®], modelo: 301-AC. Os filmes foram colocados nos tubos da cesta e o equipamento foi acionado e a contagem iniciada. O meio utilizado foi saliva artificial a $37 \pm 0,5$ °C e pH 7,0 a fim de mimetizar as condições naturais da cavidade oral. O teste foi realizado em triplicata para cada formulação (adaptado de BRASIL, 2019)

3.6.3.5 Índice de intumescimento

A absorção de água foi determinada por gravimetria. Os filmes secos foram pesados para anotar seu peso inicial. Em seguida, foram imersos em placas de Petri com saliva artificial composta por 2,38 g/L de Na₂HPO₄, 0,19 g/L de KH₂PO₄ e 8 g/L de NaCl (MASHRU et al., 2005), pH 7,0 e temperatura ambiente, numa quantidade suficiente para cobrir o material. Nos tempos de 1, 5, 15 e 30 min, 1, 4 e 24h, os filmes foram retirados da placa e novamente pesados. O excesso de água da superfície foi removido com papel absorvente. O teste foi realizado em triplicata (adaptado de PIZZOL, 2009)

Para quantificar o processo de intumescimento, o índice de intumescimento foi calculado baseando-se na fórmula 5:

Fórmula 5:
$$\text{Índice de intumescimento} = \left(\frac{W_s - W_d}{W_d} \right) \times 100$$

Onde: W_d é o peso do filme do polímero seco e W_s é o peso após o intumescimento.

3.6.3.6 Tempo de mucoadesão *in vitro*

O tempo de mucoadesão *in vitro* foi determinado utilizando um aparelho de desintegração Nova Ética®, modelo: 301-AC modificado. A saliva artificial (pH 7,0), mantida a $37 \pm 0,50$ °C, foi utilizada como meio para o teste. A mucosa jugal de suíno utilizada no estudo foi obtida por doação diretamente de um abatedouro da cidade de Paulista/PE, após o abate do animal. Aproximadamente 5 cm de comprimento desta mucosa foi fixada em uma peça de metal circular, com cola de cianoacrilato, na superfície não-mucosa. A superfície do filme mucoadesivo foi hidratada com saliva artificial colocada em contato com a membrana mucosa e peça circular foi fixada verticalmente ao aparelho e movida para cima e para baixo, de modo que o filme foi completamente imerso na saliva artificial no ponto mais baixo e emergiu no ponto mais alto. O tempo necessário para que o filme soltasse completamente da superfície da mucosa foi registrado (n = 3) (adaptado de LI et al., 2017).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO E CONTROLES FÍSICO-QUÍMICOS

A solução extrativa, obtida por digestão, apresentou coloração verde escura, odor característico e um rendimento de 75%. Os controles de qualidade são mostrados a seguir (Tabela 5).

Tabela 5 - Controles de qualidade físico-químicos da solução extrativa.

Parâmetro avaliado	Resultado \pm DP
pH	5,39 \pm 0,020
Densidade relativa (g/mL)	0,92 \pm 0,091
Teor alcoólico ($^{\circ}$ GL)	67,0 \pm 0,577
Resíduo seco (% p/v)	2,77 \pm 0,213

Legenda: DP=desvio-padrão

Fonte: Dados da pesquisa

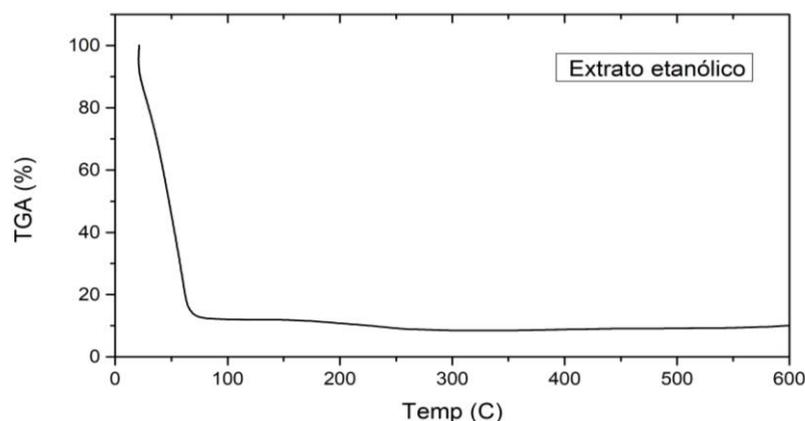
Esses ensaios são de grande importância para assegurar as características do produto obtido. Seguindo a classificação da Farmacopeia Brasileira 6^a ed, o extrato é considerado fracamente ácido. Esta característica fornece indicativos gerais da natureza dos compostos presentes no extrato (LYRA, 2013). A densidade relativa foi de 0,92 g/mL, mostrando-se um pouco menor que a da água. Esta característica era esperada pelo extrato ser obtido a partir do álcool etílico 70%, solvente extrator utilizado e que já possui densidade menor que a da água. O título etanólico observado foi de 67 $^{\circ}$ GL, mostrando que, a 20 $^{\circ}$ C, o extrato contém 67 partes de álcool etílico para 100 partes de solução, corroborando com outros resultados para outros extratos de *T. occidentalis* obtido por digestão, que também mostraram uma pequena redução nesse índice após extração. O resíduo seco permite visualizar a quantidade de substâncias sólidas extraídas da planta através da eliminação do solvente, além de ser um parâmetro utilizado para determinar a concentração do produto, que neste caso obteve 2,77g de substâncias sólidas em 100 mL de solução extrativa (ALVES, 2014; SILVA, 2016; BRASIL, 2019).

4.1.1 Perfil térmico do extrato etanólico

O perfil térmico do extrato foi avaliado por termogravimetria (TG). Segundo a Farmacopeia Brasileira (2019), essa é uma técnica em que se determina a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou tempo e aquecimento (BRASIL, 2019). Através das curvas de TG é possível também, conhecer a estabilidade das substâncias presentes na amostra.

A curva obtida para o extrato etanólico (Figura 8) apresentou um único evento térmico, que se inicia em cerca de 40°C e finaliza em 66°C, representando um total de 75,2% de perda da amostra, podendo ser atribuída a composição hidroalcoólica do extrato.

Figura 8 Curva de TG do extrato etanólico de *T. occidentalis*.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONÓIDES TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA NO UV

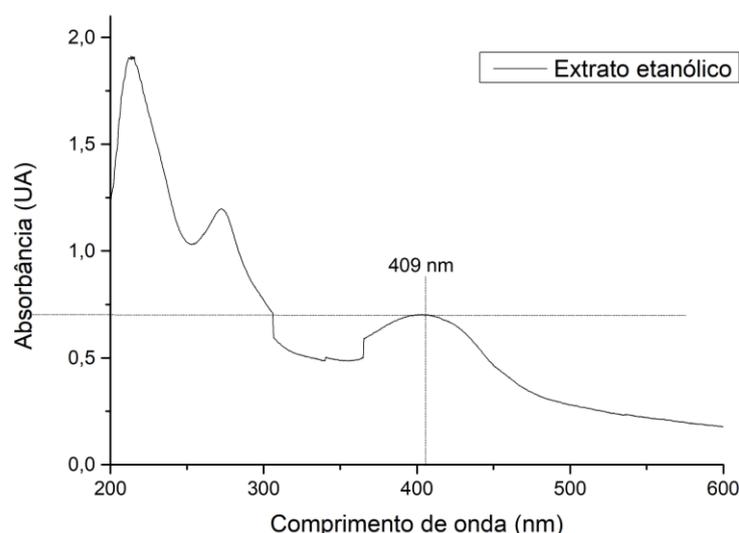
4.2.1 Desenvolvimento do método analítico

4.2.1.1 Seleção do comprimento de onda e diluição das amostras

As amostras do extrato diluído e complexado com $AlCl_3$ mostraram em seus espectros de varredura, uma absorvância máxima variante entre 403 e 413nm, por

possuir um pico mais largo, com isso selecionou-se o comprimento de 409 nm para as leituras do método proposto (Figura 9). A diluição de 1,5 mL da solução mãe do extrato (1 mg/mL) para um balão de 10 mL mostrou-se ideal para concentração de leitura das amostras, com uma absorvância média de 0,445 nm e DPR 1,5%.

Figura 9 - Espectro de varredura do extrato de *T. occidentalis* comprovando o comprimento de 409 nm como o de maior absorvância.

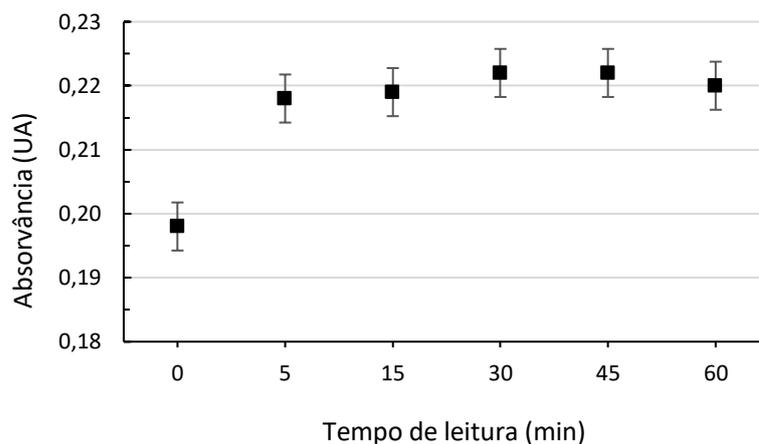


Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.1.2 Determinação do tempo de leitura

É necessário determinar o tempo ideal de complexação dos flavonoides contidos no extrato etanólico de *T. occidentalis* com o $AlCl_3$, a fim de minimizar erros sistemáticos, uma vez que, em matrizes complexas e extratos, o perfil de formação desses complexos pode mostrar-se diferente do observado para a substância padrão pura (LYRA, 2013).

Observando a cinética da reação, foi possível perceber que o tempo de leitura é uma variável importante para este estudo, uma vez que a absorvância da amostra no momento zero da reação mostra uma variação considerável quando comparada com as leituras, após alguns intervalos de tempo (Figura 10). A absorvância máxima foi obtida após 30 minutos de reação, caracterizando-a como uma complexação cinética lenta. A absorvância máxima permaneceu constante até os 45 minutos de reação. Aos 60 minutos, observou-se uma perda de absorvância das soluções.

Figura 10 - Avaliação da cinética de complexação entre flavonoides e AlCl_3 

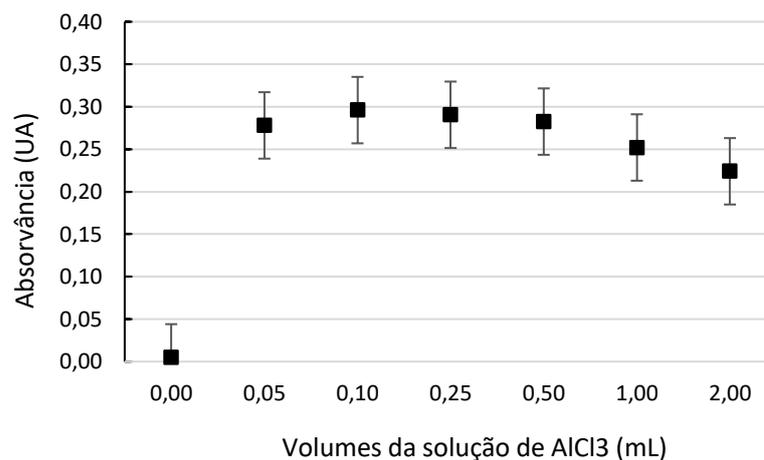
Fonte: Dados da pesquisa

Como mostrado na figura 10 a cinética possibilita a determinação do tempo de leitura das amostras em 30 min, por ser o menor tempo de leitura que proporcionou a leitura máxima de absorvância.

4.2.1.3 Avaliação do volume da solução de cloreto de alumínio

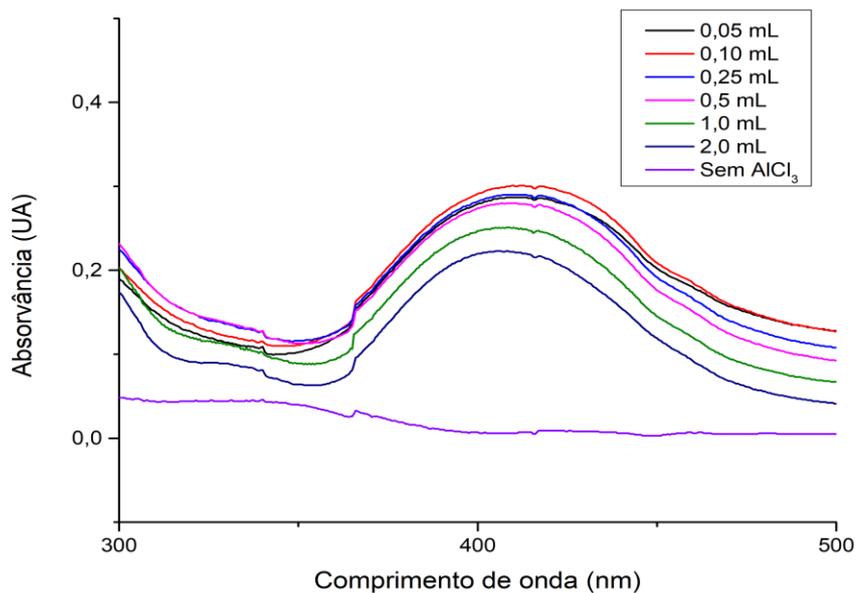
A partir da análise da variação do volume da solução metanólica de AlCl_3 a 2,5% (m/v), disponível para complexação dos flavonoides do extrato, foi possível afirmar que as amostras são sensíveis a esta alteração, sendo percebida pela variação nos valores de absorvâncias obtidos (Figuras 11 e 12)

Figura 11 - Avaliação do perfil de absorvância obtido a partir da variação de volumes da solução de AlCl_3 .



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 12 - Avaliação das curvas de absorvância obtidas a partir da variação no volume de AlCl_3 .



Fonte: Dados da pesquisa

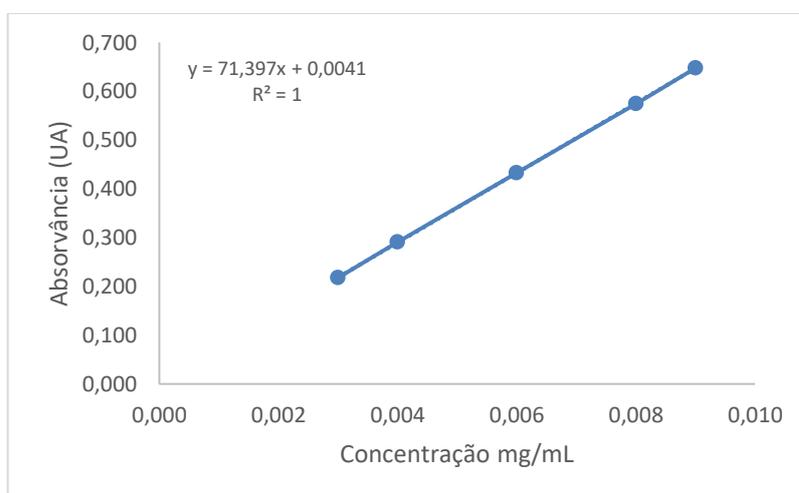
O volume de 0,10 mL foi o que demonstrou o valor de absorvância máxima no comprimento de onda de 409 nm. Com o aumento do volume, foi observada uma perda de absorvância nas amostras, o que segundo ALVES (2014), pode ser

justificado pelo deslocamento do sentido da reação de complexação flavonoides : Al^{3+} , mostrando que quantidades acima desse volume de $AlCl_3$ são excessivas no meio.

4.2.1.4 Desenvolvimento da curva padrão

Observou-se que a faixa ideal de absorção do padrão, quando correlacionado com a absorção da amostra foi de 2,5 a 10,0 μg . Os pontos da curva, então foram reajustados para 3,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 9,0 $\mu g/mL$ de quercetina (Figura 13), permitindo uma amplitude de absorvância entre 200 a 650 nm.

Figura 13 - Curva de calibração da quercetina.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.2 Validação dos procedimentos analíticos

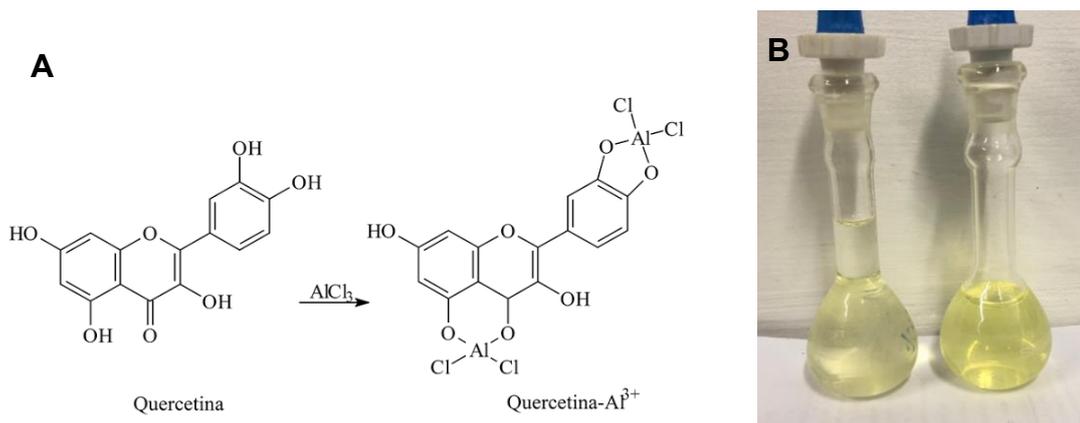
4.2.2.1 Seletividade

Para que um método seja considerado específico, ele deve possuir a capacidade de identificar ou quantificar exatamente a substância de interesse, independente da contribuição de outros constituintes, como produtos de degradação, impurezas, ou a matriz (BRASIL, 2017).

Extratos vegetais são matrizes complexas, por isso é necessário garantir que esta matriz não interfira na identificação analito de referência. No caso de determinação de flavonoides, utiliza-se o $AlCl_3$ por ser um reagente capaz de

complexar as moléculas de flavonoides da amostra, estabelecendo o complexo estável “flavonoide:Al³⁺” (Figura 14) de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de flavonoides presentes na amostra (SAVI et al., 2017). Além disso, esta complexação promove, em espectroscopia, deslocamento batocrômico (aumento do λ) e intensificação das absorções, o que permite ser quantificado sem sofrer influência de outros compostos fenólicos presentes na amostra (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

Figura 14 - Esquema ilustrado da complexação do flavonoide quercetina com cloreto de alumínio (AlCl₃) (A) e intensificação da coloração amarela (B).

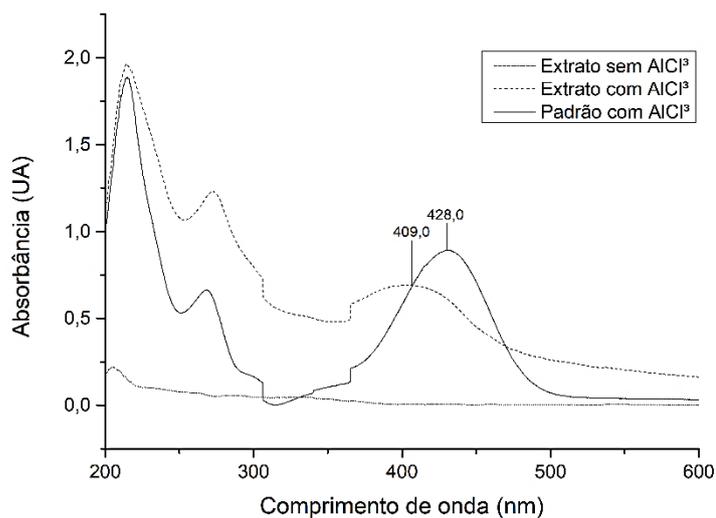


Fonte: MABRY, 1970 e dados da pesquisa.

Na figura 15, estão apresentados os espectros de varredura obtidos para a solução referência de quercetina após adição da solução metanólica de AlCl₃, em comparação com os espectros da solução extrativa de *T. occidentalis*, antes e após a adição de AlCl₃.

Observou-se que o espectro da amostra, quando complexado com AlCl₃, apresentou absorvância numa faixa semelhante, mas não igual aos da quercetina isolada, isto pode ser justificado pela presença de outros flavonoides que influenciam no comprimento de absorção máxima da amostra do extrato.

Figura 15 - Espectros de varredura mostrando a seletividade do método.

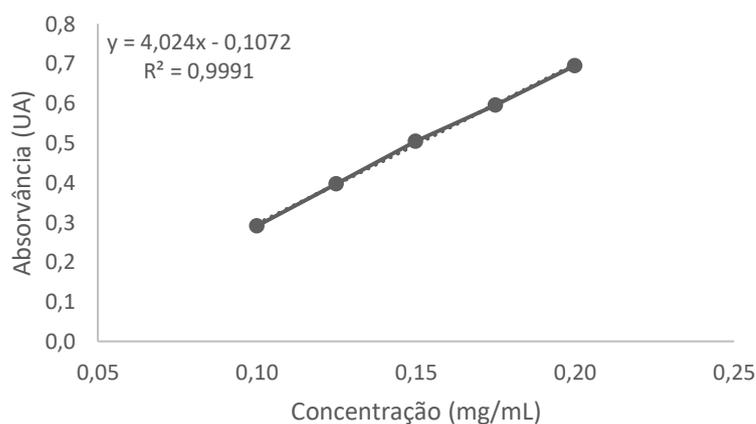


Fonte: Dados da pesquisa

4.2.2.2 Linearidade

Segundo a RDC nº 166 de 2017, a linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. Através da média de três curvas realizou-se a análise de regressão linear através do método dos mínimos quadrados, onde foi comprovada a linearidade das cinco concentrações propostas (Figura 16).

Figura 16 - Curva de regressão linear obtida a partir da média de três curvas autênticas do extrato de *T. occidentalis*.

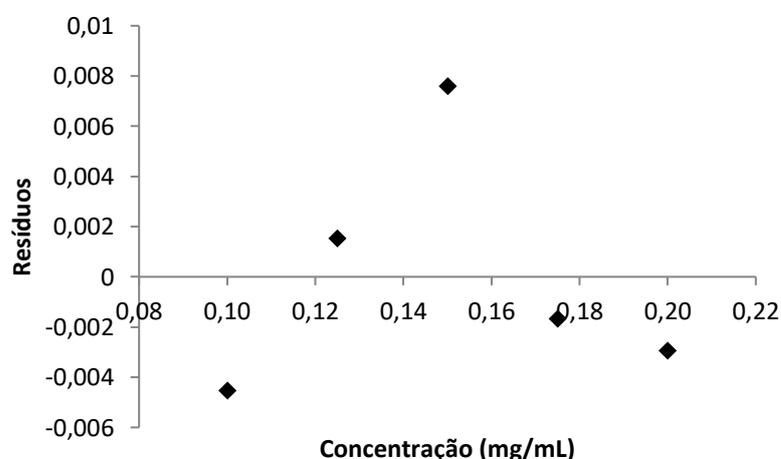


Fonte: Dados da pesquisa.

Pelo método dos mínimos quadrados obteve-se a equação da reta $y = 4,24x - 0,1072$. A análise de regressão linear apresentou um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9991, indicando que 99,91% da variação existente nos valores de y (absorvância) são explicadas pela regressão. Os dados estão em conformidade com os critérios pré-estabelecidos pela Anvisa ($R^2 > 0,990$), comprovando uma boa relação linear entre o aumento da concentração do extrato e a resposta espectrofotométrica.

A adequação do ajuste linear à curva de calibração foi confirmada através do gráfico de resíduo, que se mostraram distribuídos aleatoriamente em torno do zero, sem tendências e com variância constante, como mostra a figura 17, sendo este considerado um resultado satisfatório.

Figura 17 - Perfil da dispersão dos resíduos do ensaio de linearidade.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.2.3 Robustez

A robustez é um parâmetro que permite verificar a capacidade do método de resistir a pequenas e deliberadas variações durante o processo. Esta etapa é importante para determinar as precauções requeridas ao método em casos de susceptibilidade a variações nas condições analíticas. Os resultados da robustez estão sumarizados na Tabela 6, em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 6 – Análise do ensaio da robustez do método.

Parâmetros	Variáveis	Teor de flavonoides totais* (ug/mL) ± DP	DPR (%)	Fatores
Tempo de leitura (min)	25	6,20 ± 0,06	1,06	F _{calculado} : 4,01
	30	6,23 ± 0,07	1,18	F _{tabelado} : 5,14
	35	6,21 ± 0,17	2,75	
Volume de AlCl₃ (%)	90	6,59 ± 0,04	0,68	F _{calculado} : 0,65
	100	6,40 ± 0,04	0,66	F _{tabelado} : 5,14
	110	6,56 ± 0,14	2,13	
Luminosidade	Presença de luz	6,31 ± 0,04	0,58	F _{calculado} : 6,75
	Ausência de luz	6,40 ± 0,04	0,66	F _{tabelado} : 7,70

*Resultado expresso em quantidade de quercetina; DP= desvio-padrão; DPR%= desvio-padrão relativo

Fonte: Dados da pesquisa.

A partir dos dados expostos foi possível observar estatisticamente, através do ANOVA fator único, que o método se mostrou robusto uma vez que os F_{calculados} foram inferiores aos F_{tabelados}, não existindo variação estatisticamente significativa, em um nível de 95% de confiança.

4.2.2.4 Precisão

O ensaio de precisão é realizado com o intuito de avaliar a proximidade de resultados obtidos a partir da utilização do método a ser validado. Os resultados obtidos para o parâmetro repetibilidade e precisão intermediária estão dispostos na Tabela 7.

Os procedimentos proporcionaram respostas espectrofotométricas precisas nos dois níveis analisados. A repetibilidade é mostrada na primeira linha da tabela 5, onde o analista 1, no dia 1 realizou o preparo de seis amostras a 100% em uma única corrida analítica. A solução extrativa apresentou uma absorvância média de $0,447 \pm 0,04$ e Desvio-padrão Relativo (DPR) de 1,46%, sendo considerado um valor baixo. Com isso, é possível concluir que os resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Tabela 7 - Análise do ensaio de precisão.

Amostras	Precisão						Média	DP	DPR (%)
	1	2	3	4	5	6			
Analista 1 /									
Dia 1	0,439	0,456	0,450	0,446	0,442	0,453	0,447	0,006	1,46
Analista 2 /									
Dia 2	0,444	0,440	0,445	0,442	0,446	0,443	0,443	0,002	0,49
Determinações entre grupos:							0,445	0,003	0,69

DP= desvio-padrão; DPR%= desvio-padrão relativo

Fonte: Dados da pesquisa.

A precisão intermediária é determinada quando comparados os resultados encontrados no dia 1 com os resultados encontrados por outro analista no dia 2. O DPR obtido quando comparados estas duas determinações foi de 0,69%. Os dados também foram avaliados estatisticamente pelo ANOVA fator único, tendo o $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, 2,38 e 4,96 respectivamente.

4.2.2.5 Exatidão

A exatidão é o parâmetro que correlaciona o valor teórico esperado com o valor real obtido. Foi determinado a partir de ensaios de recuperação do marcador presente. A tabela 8 apresenta os resultados alcançados por este ensaio, mostrando que o método apresentou recuperação acima de 99% nas três concentrações avaliadas, com um DPR máximo de 2,74%, considerado um valor satisfatório, podendo avaliar o método como exato para quantificação de quercetina na amostra de estudo.

Tabela 8 - Recuperação da quercetina em amostras do extrato de *T. occidentalis*.

Nível (%)	[]* Teórica (µg/mL)	Amostra	[] Experimental (µg/mL)	Recuperação média (%)	DP	DPR (%)
50	7,42	1	7,55	99,2	2,21	2,23
		2	7,24			
		3	7,30			
100	9,78	1	10,34	104,4	1,07	1,03
		2	10,15			
		3	10,15			
150	13,54	1	11,75	99,42	2,74	2,75
		2	12,17			
		3	12,41			

Legenda: [] = Concentração; DP = desvio-padrão; DPR = desvio-padrão relativo

Fonte: Dados da pesquisa.

4.2.3 Determinação do teor de flavonoides totais

A partir da equação da reta obtida para a curva padrão ($y=71,397x+0,0041$), com coeficiente de correlação linear de 1, chegou-se a um teor de flavonoides totais, expressos em quercetina, de $15,53 \pm 0,438$ EQ%/g de extrato etanólico.

4.3 OBTENÇÃO E CONTROLES DO EXTRATO SECO À BASE DE *T. occidentalis*.

O extrato apresentou-se com coloração verde escura e odor forte característico do material vegetal (Figura 18).

A perda por dessecação expressa o percentual de substância volátil de qualquer natureza presente na amostra. Segundo a Farmacopeia Brasileira 6ª ed, extratos secos devem possuir uma perda por dessecação não superior a 5% (p/p). Para o extrato seco de *T. occidentalis*, obteve-se uma perda por dessecação de $4,13\% \pm 0,09$, estando dentro do limite estabelecido, o que é importante para assegurar uma estabilidade microbiológica e até mesmo química ao material (LYRA, 2013).

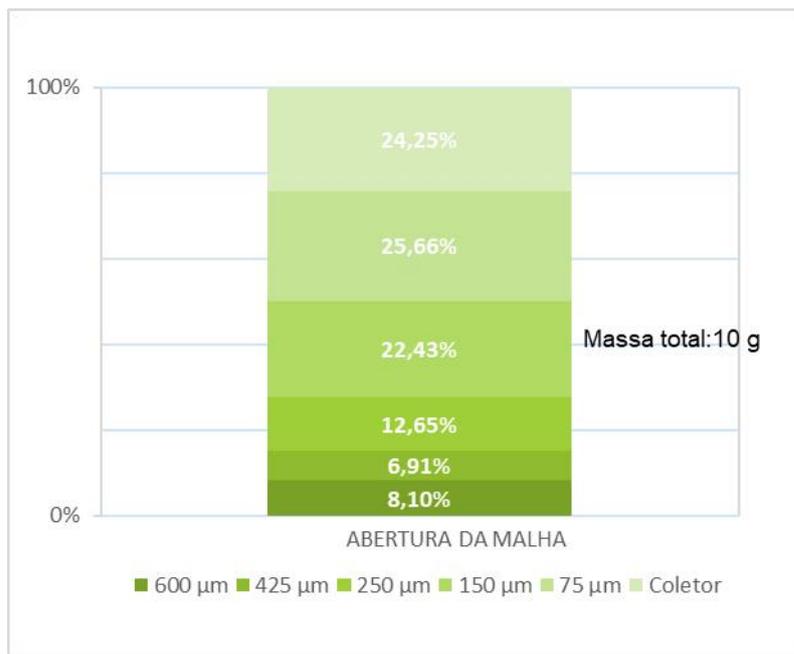
Figura 18 - Imagem macroscópica do extrato seco de *T. occidentalis*.



Fonte: Dados da pesquisa.

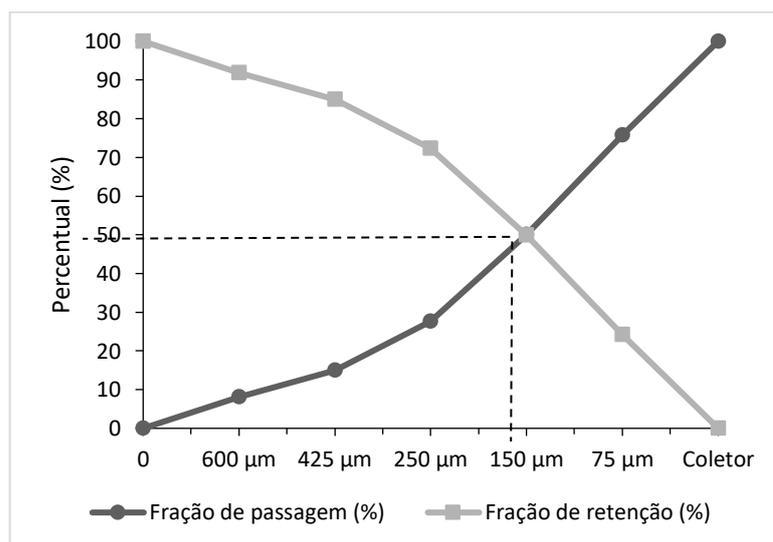
O pó foi submetido à análise granulométrica, a fim de obter o tamanho médio e conhecer o perfil de distribuição de tamanho das partículas do material. Através do gráfico obtido, a partir da separação granulométrica do extrato seco de *T. occidentalis* (Figura 19), é possível perceber uma heterogeneidade quanto ao tamanho das partículas. O material teve considerável retenção a partir do tamis de abertura 150 μm (22,43%), no tamis 75 μm foi onde houve maior retenção do material (25,66%), porém, um percentual considerável do pó (24,25%) ficou depositado no coletor. A partir do ponto de interseção das curvas de retenção e passagem (Figura 20) chegou-se ao tamanho médio das partículas de 150,62 μm . De acordo com critérios farmacopeicos, o pó foi considerado como pó fino. Essa característica mostra boa superfície de contato do material e melhor homogeneidade (ALVES, 2014; BRASIL, 2019).

Figura 19 - Distribuição granulométrica do extrato seco de *T. occidentalis*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 20 - Curva de retenção e passagem do extrato seco de *T. occidentalis*.



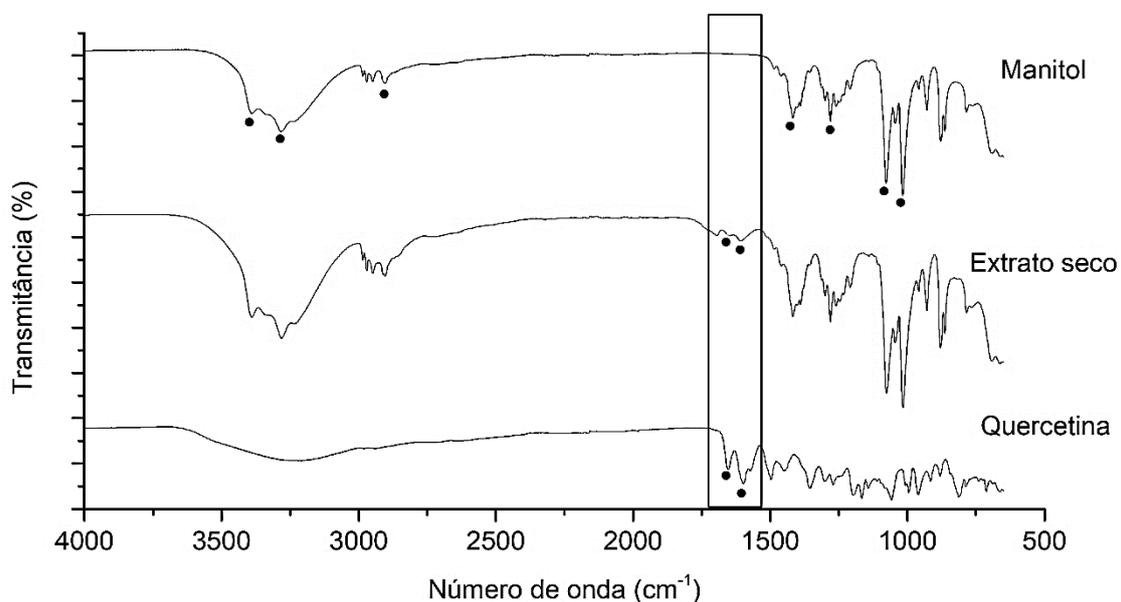
Fonte: Dados da pesquisa.

4.3.1 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho é uma técnica bastante utilizada para caracterização de materiais. Baseia-se nas características vibracionais de ligações

químicas quando uma radiação na região IV é incidida na amostra, permitindo identificar os grupos funcionais existentes a partir de um espectro (ROSA, 2019). Analisando o espectro do manitol puro, mostrado na figura 21 é possível observar uma banda larga entre 3389 e 3281 cm^{-1} , correspondentes aos estiramentos dos grupos funcionais hidroxila. Em 2985 cm^{-1} , verificou-se, com uma baixa intensidade, a deformação axial referente ao grupamento -CH, em 1417 cm^{-1} , a deformação angular simétrica no plano (tesoura) do grupamento -CH₂, e em 1300 cm^{-1} , a deformação angular no plano do grupo hidroxila. Também é possível ver no espectro os modos vibracionais de forte intensidade em 1077 e 1017 cm^{-1} , que estão associados à ligação C-O dos estiramentos das hidroxilas da molécula do manitol, que consiste em um poliálcool.

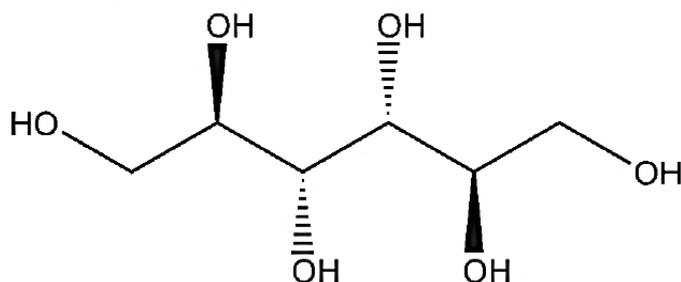
Figura 21 - Espectros na região do infravermelho obtidos sobre o manitol puro, extrato seco de *T. occidentalis* e do flavonóide quercetina.



Fonte: Dados da pesquisa.

O espectro obtido sobre a amostra de manitol revelou todos modos vibracionais próprios de sua molécula (Figura 22).

Figura 22 - Estrutura química do manitol.

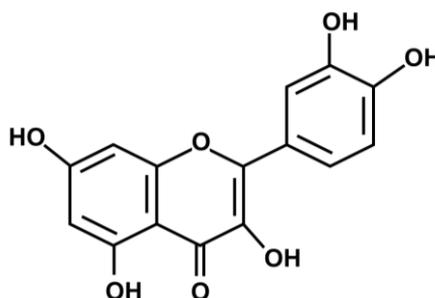


Fonte: (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

O espectro resultante do infravermelho do extrato seco (Figura 21) reproduziu todos os modos vibracionais característicos do manitol, porém os estiramentos 1694 e 1605 cm^{-1} permitem comprovar através desse método de caracterização que as duas amostras analisadas são diferentes. O mesmo ocorreu no estudo realizado por SAVICKI e colaboradores (2019), onde utilizou-se esse mesmo excipiente como matriz para incorporação da carboplatina e, na amostra, foi observado todos picos do manitol e também outros, característicos do fármaco.

Quando se compara o perfil do extrato com o do flavonoide quercetina, comprovadamente presentes nesse extrato, é possível perceber que esses modos vibracionais também estão presentes, permitindo sugerir que estes estiramentos correspondam às estruturas características dos flavonoides presentes no extrato. Alguns estudos mostram que o estiramento 1694 cm^{-1} refere-se à carbonila ($\text{C}=\text{O}$) deslocada por ligações de hidrogênio intramoleculares e o estiramento 1605 cm^{-1} representa deformação axial de $\text{C}=\text{C}$ referente aos anéis aromáticos da estrutura (Figura 23) (SIMÕES et al., 2013; TINI, 2013).

Figura 23 - Estrutura química do flavonoide quercetina.



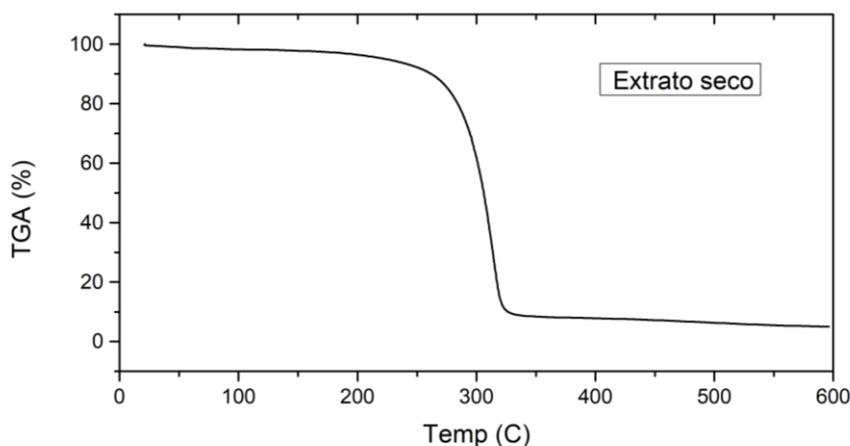
Fonte: Autoria própria.

4.3.2 Perfil térmico do extrato seco

A curva obtida para o extrato seco apresentou um único evento térmico, iniciando-se em cerca de 300°C e finalizando em 325°C, representando uma perda de massa de 89,5%. Comparando este resultado com o visto anteriormente para o extrato etanólico (4.1.1), foi possível observar que o extrato seco obtido possuiu uma estabilidade térmica superior, o que é considerada uma boa característica de perfil térmico.

O perfil da perda de massa obtida para o extrato seco (Figura 24) foi similar ao encontrado por COSTA (2005) para o manitol puro, onde chegou-se a um ponto médio de 359,10°C, mostrando que assim como nos resultados obtidos por FT-IR, o perfil do extrato seco é muito semelhante ao do adjuvante farmacêutico utilizado para sua secagem.

Figura 24 - Curva de TG do extrato seco de *T. occidentalis*.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DO EXTRATO ETANÓLICO E SECO DE *Thuja occidentalis*.

As placas de microtitulação foram submetidas a leitura visual após 24 e 48 horas da realização do teste, comparando aos poços de controle positivo (fungo) e negativo (meio de cultura) utilizando a turvação existente em cada orifício do meio

como parâmetro de leitura. Para os extratos de *T. occidentalis* foi observado um comportamento fungistático, assim como comportamento definido para fármacos azólicos, a exemplo de miconazol, clotrimazol e fluconazol (CASTRO et al., 2016). A partir disso, foi possível determinar a CIM₅₀ dos extratos, ou seja, as menores concentrações capazes de inibir 50% do crescimento fúngico em relação ao inóculo. Os resultados são mostrados na tabela 9.

Tabela 9 – Concentrações Inibitórias Mínimas capazes de inibir 50% do inóculo (CIM₅₀) dos extratos de *T. occidentalis* frente cepas de *Candida sp.*

Isolado fúngico	Extrato etanólico* (µg/mL)	Extrato seco (µg/mL)
<i>Candida albicans</i>	512	256
<i>C. glabrata</i>	16	**
<i>C. krusei</i>	256	64
<i>C. parapsilosis</i>	128	64
<i>C. tropicalis</i>	512	128

*Extrato etanólico 70%; **O estudo apresentou contaminação, impossibilitando leitura.

Fonte: Dados da pesquisa

Ambos os extratos mostraram atividade antifúngica para as diferentes espécies de *Candida* testadas. Verificou-se para o extrato etanólico valores de CIM₅₀ entre 16 e 512 µg/mL, sendo o maior valor encontrado para as cepas de *C. tropicalis* e *C. albicans*. O melhor valor de CIM₅₀ encontrado para esse extrato foi de 16 µg/mL frente ao isolado de *C. glabrata*. Para o extrato seco os resultados variaram de 64 a 256 µg/mL e se mostraram melhores que os obtidos para o extrato etanólico, uma vez que considera-se de melhor potência o material que possibilita a inibição fúngica em menor concentração (CASTRO et al., 2016). Segundo Alves, 2014, esta atividade pode estar associada com a elevada percentagem de α- e β-tujona presente no extrato, porém é necessária a realização de análises complementares para uma segura determinação.

A atividade antifúngica dos extratos de *T. occidentalis* verificada neste trabalho corrobora com resultados encontrados na literatura que já haviam confirmado essa

atividade farmacológica da planta (TSIRI et al., 2009; ALVES, 2014). No estudo realizado por TSIRI, 2009 foi determinada a atividade antifúngica do óleo essencial da planta, obtendo concentrações inibitórias entre 1,35 e 1,87 mg/mL para cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Comparando esses resultados, é possível dizer que os extratos testados neste estudo têm melhor atividade antifúngica do que o óleo essencial de *T. occidentalis*, uma vez que as concentrações inibitórias são menores.

No estudo realizado por Alves 2014, foi testado o mesmo extrato etanólico, porém não foi possível correlacionar diretamente os resultados com o obtido neste estudo uma vez que no estudo citado os resultados de CIM foram expressos em µg/mL de quercitrina, onde para a cepa de *C. krusei* foi obtido CIM de 2,08 µg/mL de quercitrina e para as cepas *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* CIM de 8,32 µg/mL de quercitrina.

Por fim, os resultados obtidos para o gênero *Cândida sp.* neste estudo são positivos, uma vez que autores relatam a ocorrência de resistência aos antifúngicos comumente usados em isolados de cepas desse gênero (GIORDANI; SANTIN; CLEFF, 2015; SILVA, 2019).

4.5 OBTENÇÃO DE FILMES MUCOADESIVOS CONTENDO EXTRATO DE *Thuja occidentalis*.

4.5.1 Desenvolvimento dos lotes de bancada dos filmes-base mucoadesivos

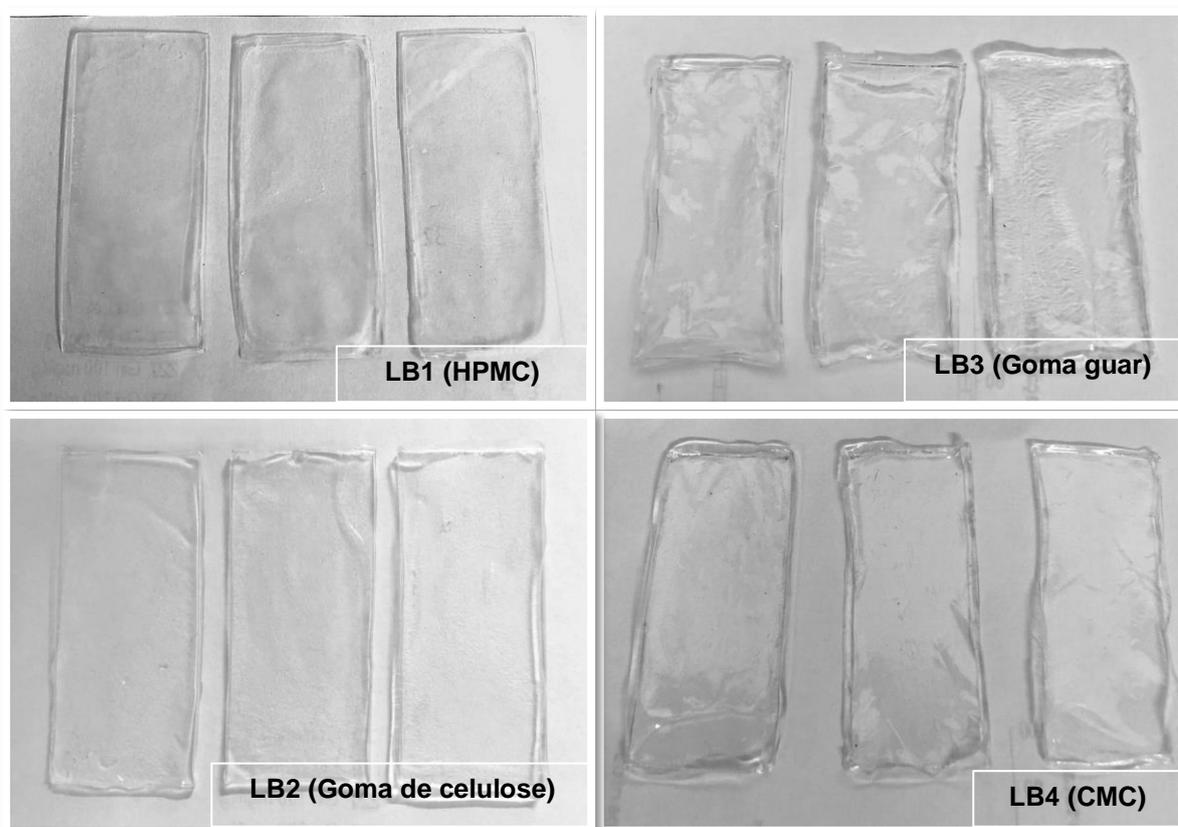
Considerando os aspectos visuais de homogeneidade, plasticidade, flexibilidade e textura, chegou-se a um lote de bancada base, considerado satisfatório para cada um dos polímeros mucoadesivos testados. O principal critério para escolha das formulações baseou-se em aspectos macroscópicos, partindo de que os filmes não deveriam mostra-se frágeis, quebradiços ou pegajosos e necessitariam mostrar-se homogêneos, sem bolhas ou manchas (DIXIT; PUTHLI, 2009).

Os filmes base obtidos a partir de goma de celulose, goma guar e CMC, mostraram-se com aspecto mole e pegajoso. Visando a melhoria desse aspecto, o amido pré-gelatinizado foi adicionado à formulação, uma vez que estudos mostram que a mistura de polímeros nas formulações é uma técnica bastante eficiente, ajudando a melhorar diversas características dos filmes (DIXIT; PUTHLI, 2009; BODINI, 2015). O amido é comumente um excipiente de escolha nesses casos pelo

seu baixo custo e por possuir propriedades de adesão, gelificação e retenção de umidade, sendo também um material não tóxico, essencial para a filmes mucoadesivos. Outra característica muito importante do amido é ser um agente texturizante, motivo este de ter sido escolhido como copolímero para as formulações dos filmes de *T. occidentalis* (BODINI, 2015; PEROZZI, 2018).

Testaram-se concentrações de amido pré-gelatinizado de maneira crescente para cada uma das formulações filmogênicas. Para as formulações à base de goma de celulose a concentração de 0,6% foi suficiente para melhorar o aspecto pegajoso e a textura do filme. Já os filmes de CMC e goma guar necessitaram de uma concentração maior, chegando a 2,4% do copolímero. Os filmes de goma guar, contudo, mantiveram um aspecto pegajoso, sendo necessário além do amido, a diminuição do percentual do sorbitol de 5% para 3%, chegando nas formulações mostradas na figura 25, que se mostraram satisfatórias quanto a todos os parâmetros macroscópicos citados.

Figura 25 - Filmes base obtidos.



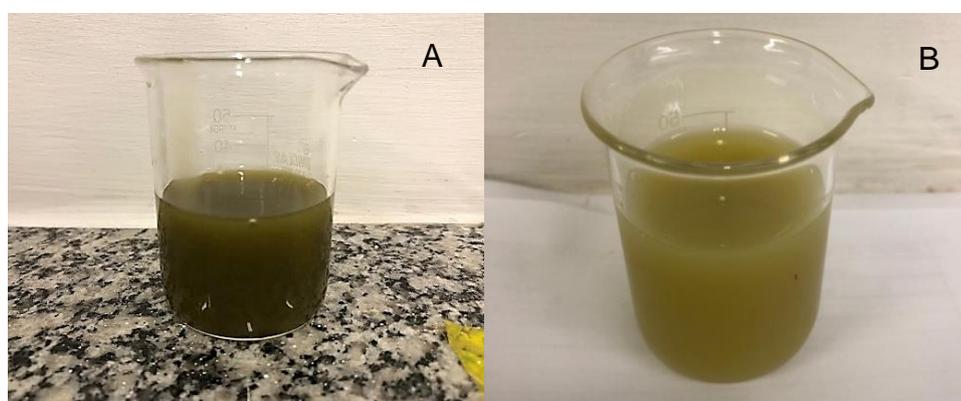
Fonte: Dados da pesquisa.

A partir dessas formulações base, o extrato etanólico e seco de *T. occidentalis* e os demais excipientes para melhoramento dos filmes foram incorporados.

Escolheu-se o xilitol para agente edulcorante da formulação pois, além de configurar o sabor doce, seu consumo é permitido para pacientes diabéticos e possui ação preventiva contra cáries dentárias (SOUSA, 2014). Já os estimulantes de saliva são comumente utilizados nesse tipo de formulação para aumentar a taxa de produção salivar e conseqüentemente favorecer o intumescimento do filme e sua adesão à mucosa, sendo o ácido cítrico o mais utilizado (DIXIT; PUTHLI, 2009; GARSUCH; BREITKREUTZ, 2009, 2010). O agente plastificante é essencial a esse tipo de forma farmacêutica, por melhorar as propriedades físicas dos filmes obtidos, como a flexibilidade e a resistência aparente. Além dessas propriedades, o sorbitol foi escolhido por agregar no caráter doce da formulação, tendo poder edulcorante de 50 a 60% em relação à sacarose e por tratar-se também de uma substância não cariogênica (TARDELLI, 2010).

As formulações filmogênicas finais obtidas com extrato seco tiveram uma coloração verde escura, já as formulações de extrato etanólico mostraram uma coloração verde clara (Figura 26).

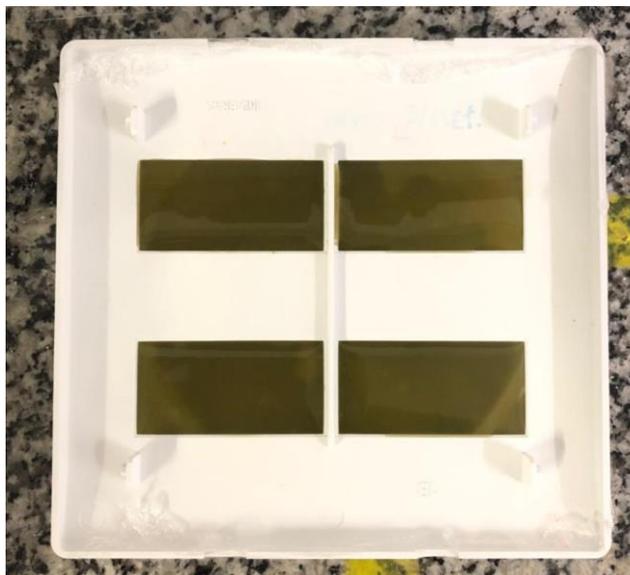
Figura 26 - Formulação obtida a partir da goma de celulose com extrato seco de *T. occidentalis* incorporado (A) e formulação obtida a partir do CMC com o extrato etanólico incorporado (B).



Fonte: Dados da pesquisa

Quanto a secagem dos filmes, observou-se que os filmes levaram de 5 a 7 horas para uma completa secagem na temperatura de 40 °C (Figura 27).

Figura 27 - Forma de plástico utilizada para secagem dos filmes.



Fonte: Dados da pesquisa

4.5.2. Filmes mucoadesivos incorporados dos extratos etanólico e seco de *T. occidentalis*.

4.5.2.1 Aspecto visual

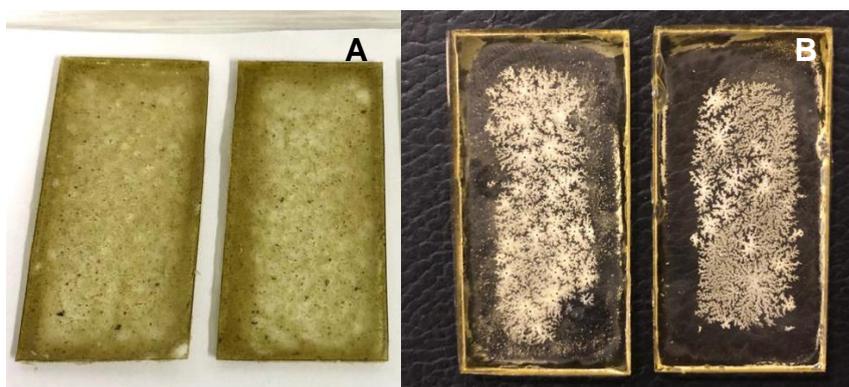
Assim como no item 4.4.1, as características macroscópicas dos filmes foram avaliadas, a fim de verificar qualquer alteração no aspecto final dos filmes, após a incorporação dos extratos, do estimulador de saliva, do edulcorante e dos conservantes na formulação.

A avaliação visual dos filmes foi realizada com base na homogeneidade, capacidade de formação de filme e manuseabilidade. Partindo disso, foram considerados bons filmes aqueles que apresentaram coloração uniforme, ausência de partículas insolúveis, sinais de bolhas ou áreas frágeis, ausência de zonas de descontinuidade (áreas mais finas e áreas mais espessas), após a etapa de secagem e a facilidade de retirada do filme da forma.

Os filmes obtidos com HPMC (LB5), após a incorporação do extrato seco adquiriram aspecto opaco e quebradiço e algumas partículas permaneceram insolúveis. Já nos filmes obtidos com adição do extrato etanólico (LB8), a pesar do

filme ter aspecto transparente, foi observada presença de ranhuras semelhantes a cristalizações (Figura 28). Devido a todas as variáveis existentes na obtenção do filme, a causa dessas características pode ser multifatorial (COUTO, 2015), porém uma das possíveis justificativas para o aparecimento dessas possíveis cristalizações seria devido a incompatibilidade entre os excipientes adicionados na formulação final do filme (ABRUZZO et al., 2012; MEHER et al., 2013). Para a certificação dessa teoria, é necessária a realização de ensaios de compatibilidade entre todos os insumos utilizados na composição do filme.

Figura 28- (A) Filmes de HPMC obtidos com extrato seco (B) Filmes de HPMC obtidos com extrato etanólico.

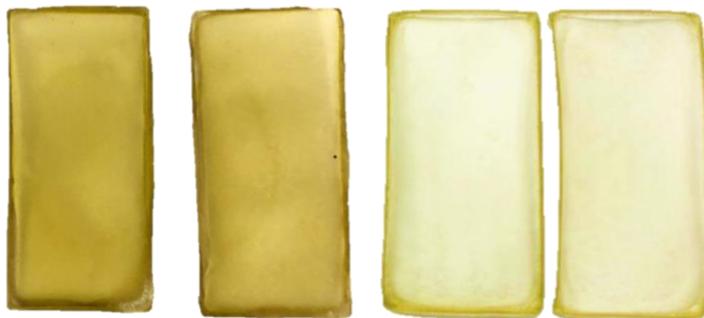


Fonte: Dados da pesquisa.

Os filmes obtidos a partir da goma guar (LB7 e LB9) mostraram-se visualmente uniformes, porém pouco maleáveis e frágeis na retirada da forma, sendo necessário um reajuste na formulação para o melhoramento dessas características.

Quanto aos filmes obtidos a partir da goma de celulose e do CMC (LB6 e LB10, respectivamente), visualmente mostraram-se homogêneos, sem partículas insolúveis, bolhas ou zonas de descontinuidade (Figura 29), adequando-se a todas as características visuais importantes para um filme ser considerado bom, por isso foram escolhidos para dar continuidade ao estudo.

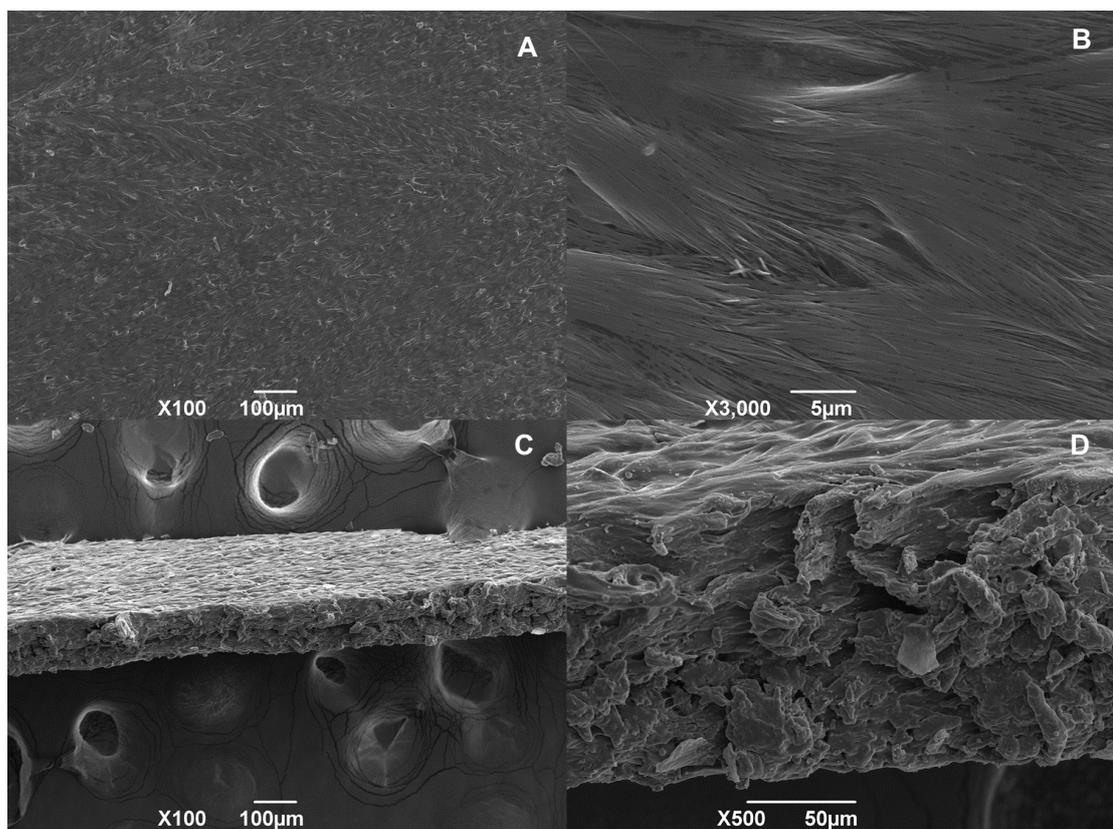
Figura 29 - Filmes de goma de celulose com extrato seco (LB6) e filmes de CMC com extrato etanólico (LB10).



Fonte: Dados da pesquisa.

As microscopias eletrônicas de varredura desses filmes são mostradas nas figuras 30 e 31:

Figura 30 - Eletomicrografias do filme LB6.



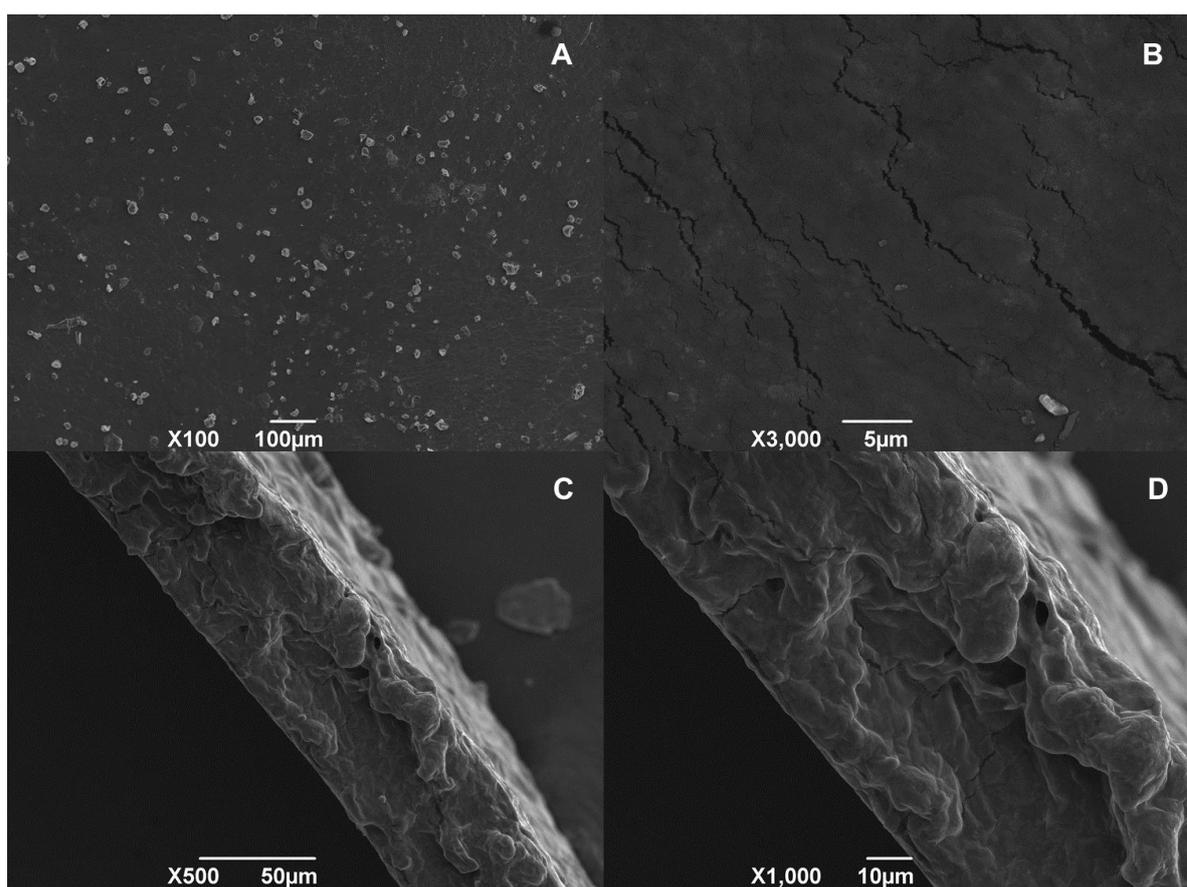
Legenda: A) Aumento de x100 da superfície B) Aumento de x3000 da superfície. C) Aumento de x100 da secção transversal D) Aumento de x500 da secção transversal.

Fonte: Dados da pesquisa.

Observando as imagens obtidas pelo MEV, é possível perceber que as características morfológicas dos filmes mostraram-se dependentes do polímero formador utilizado.

No filme LB6 (Figura 30) sua estrutura superficial é percebida em forma de “fibras”. Nas imagens de secção transversal nota-se uma estrutura lamelar do filme. Assim como analisado macroscopicamente, os filmes apresentaram-se bastante regulares, sem bolhas ou partículas insolúveis.

Figura 31 - Eletromicrofotografias do filme LB10.



Legenda: A) Aumento de x100 da superfície B) Aumento de x3000 da superfície C) Aumento de x500 da secção transversal D) Aumento de x1000 da secção transversal.

Fonte: Dados da pesquisa.

Já analisando as microfotografias do filme LB10 (Figura 31), nota-se a presença de micropartículas dispersas superficialmente no filme e na imagem B, com o aumento de 3.000x é possível visualizar microrachaduras nessa superfície. Na secção transversal nota-se a matriz com uma característica irregular, porém bastante

compacta e coesa. Pode-se sugerir que essa coesão tenha sido causada pela grande quantidade de amido utilizada na formulação (2,4%), porém, para confirmação, seria necessário a realização da técnica em filmes sem o amido, para comparação.

Partindo desses dois lotes, considerados como as melhores formulações, foi realizada uma variação quantitativa do polímero a fim de determinar a melhor concentração a ser utilizada, baseando-se principalmente na propriedade mucoadesiva de cada um dos filmes. Para os filmes de goma de celulose variou-se de 2,4% para 1,8 e 3,0% e para os filmes de CMC, variou-se de 2,4% para 1,8% e 3,0%.

4.5.2.2 Controles de qualidade físico-químico dos filmes mucoadesivos

Os dados de uniformidade de peso e espessura obtidos estão mostrados na tabela 10.

Tabela 10 - Uniformidade de peso e espessura dos filmes obtidos.

Lote	Base (%)	Uniformidade de peso (g) ± DP	DPR (%)	Espessura (mm) ± DP	DPR (%)	Tempo de desintegração
LB11	Goma de Cel. 1,8	0,2342 ± 0,005	2,1	0,2124 ± 0,014	6,6	>120 min
LB6	Goma de Cel. 2,4	0,2462 ± 0,006	2,4	0,2236 ± 0,016	7,2	>120 min
LB12	Goma de Cel. 3,0	0,2504 ± 0,003	1,2	0,2069 ± 0,016	7,9	>120 min
LB13	CMC 0,6	0,1705 ± 0,005	2,9	0,1013 ± 0,007	7,3	>120 min
LB10	CMC 0,8	0,1590 ± 0,002	1,2	0,1020 ± 0,007	6,9	>120 min
LB14	CMC 1,0	0,1577 ± 0,002	1,3	0,1000 ± 0,003	3,3	>120 min

Legenda: DP= desvio-padrão; LB= Lote de bancada; Goma de cel= Goma de celulose; CMC= Carboximetilcelulose

Fonte: Dados da pesquisa

Avaliando os resultados mostrados na tabela 10, foi possível observar que o peso dos filmes variou entre 0,1577 g a 0,2504 g. Os filmes obtidos com a goma de celulose mostraram maior massa do que os obtidos a partir do CMC. É possível observar que o aumento no percentual da goma celulose foi acompanhado pelo aumento do peso dos filmes, o que não ocorreu nos filmes obtidos com CMC. Isso

pode ser justificado pela baixa densidade característica do excipiente (0,4 g/mL), comprovando que com o aumento de sua quantidade na formulação favorece uma diminuição de peso.

Ainda observando a tabela 10 percebe-se o mesmo perfil de comportamento, os filmes obtidos a partir da goma apresentaram maior espessura média, entre 0,2069 e 0,2236 mm, do que os filmes obtidos a partir do CMC, que se mostraram mais finos, variando de 0,1000 a 0,1020 mm.

Porém, quanto a espessura um fator importante a ser observado é o desvio-padrão relativo (DPR%) obtido, que se mostrou elevado para todos os lotes, com uma média de 6,5%, esse resultado é justificado pela diferença na espessura encontrada no centro dos filmes, sendo esta região mais fina em todos os lotes testados. Contudo este fato está mais relacionado com a forma utilizada na secagem dos filmes do que com a própria formulação, indicando que se deve pensar em alternativas que diminua esse efeito.

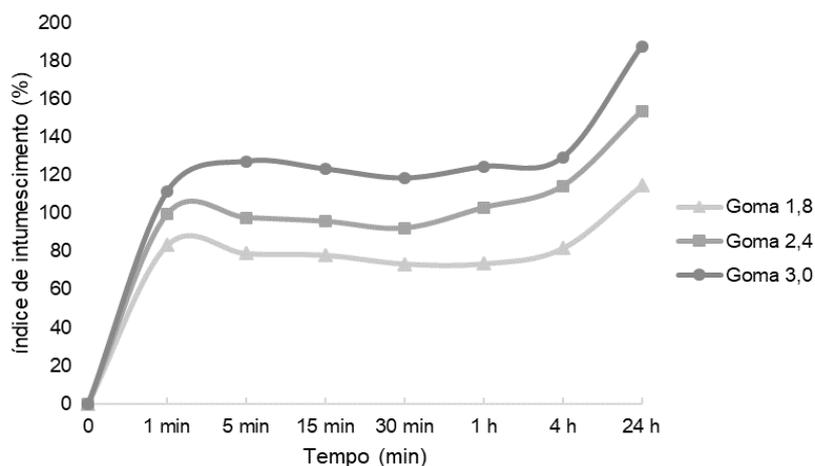
O ensaio de desintegração dos filmes foi interrompido no tempo de 120 min, uma vez que todos os filmes ainda se apresentaram íntegros nesse tempo, sendo considerado suficiente para determinar que os filmes não são de rápida desintegração e podem ser uma alternativa para uma liberação mais prolongada de ativos.

4.5.2.3 Índice de intumescimento

O intumescimento dos filmes ocorre a partir da transferência de moléculas de água do muco para o polímero. Esse índice varia de acordo com a capacidade de hidratação de cada polímero, quanto melhor sua molhabilidade, melhor a intercalação com as glicoproteínas presente no muco (AGUIAR, 2016).

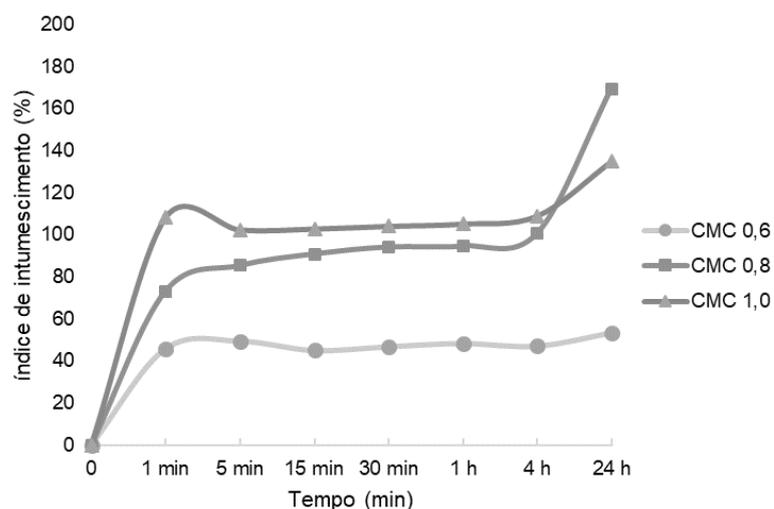
À capacidade de intumescimento dos filmes obtidos está mostrada nas figuras 32 e 33:

Figura 32 - Índice de intumescimento dos filmes de goma de celulose.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 33 - Índice de intumescimento dos filmes de CMC.



Fonte: Dados da pesquisa.

Mediante a análise dos perfis de intumescimento, é possível verificar que todas as formulações apresentaram uma captação de água inicial rápida, chegando a um aumento de massa no primeiro minuto de 83 a 111% para os filmes de goma de celulose, e de 45 a 108% para os filmes obtidos com CMC. Foi notório também, o aumento de tamanho dos filmes, que ficaram cerca de 22 a 27% maior do que os filmes originais, que mediam 4,4 x 2,2 cm.

Após esse aumento observado no tempo de 1 minuto, percebe-se uma pequena diminuição no grau de intumescimento dessas formulações, podendo ser atribuída ao início do processo de erosão sofrido pelos filmes, com decorrer do tempo, em contato com o meio. Essa erosão é percebida para todos os sistemas testados, assim como foi descrito em outros trabalhos (PIZZOL, 2009; CORDEIRO, 2015).

Nota-se que, entre os tempos de 5 minutos a 4 horas de contato a variação do intumescimento é praticamente inexistente em todas as formulações. Após o tempo de 24 h percebeu-se um aumento bastante significativo em todas as amostras testadas, porém esse aumento pode ser um falso resultado, uma vez que nesse tempo os filmes já estavam desintegrando-se, prejudicando um pouco o processo de secagem e pesagem.

No geral, os filmes obtidos com a goma de celulose tiveram uma faixa intumescimento maior, entre 80 a 120%, do que os filmes de CMC, que ficou na faixa dos 45 a 105%. Isso é explicado devido às características de intumescência de cada polímero. A presença de grupos carboxila e hidroxila na estrutura do polímero permite o estabelecimento de ligações de hidrogênio com o substrato, aumentando assim o caráter hidrofílico e provocando a intumescência do polímero (PEREIRINHA; FIGUEIRAS, 2014).

O índice de intumescimento de cada filme respeitou o aumento no percentual de polímeros utilizados em suas formulações. Em ambos os casos os filmes com maior percentual de polímero foi o filme com maior intumescimento, sendo a concentração de 3,0% para os filmes de goma de celulose, e os de 1,0% para a formulação à base de CMC.

4.5.2.4 Tempo de mucoadesão *in vitro*

O principal fator envolvido na seleção do polímero apropriado para a formulação de filmes bucais mucoadesivos é a propriedade mucoadesiva (ANSARI; SADARANI; MAJUMDAR, 2018). Porém, para a realização desses experimentos, é de extrema importância a utilização de uma mucosa oral fresca de modelos animais, a fim de mimetizar ao máximo as condições fisiológicas da mucosa oral humana (PERIOLI et al., 2004). Partindo disso, utilizou-se da mucosa jugal fresca de suínos, retirada no dia anterior ao experimento.

O trabalho de mucoadesão é aquele necessário para o rompimento da interação entre o sistema mucoadesivo, nesse caso, os filmes e a mucosa utilizada. Ele pode ser determinado de acordo com o tempo de duração dessa interação e de acordo com a força necessária para o rompimento (AGUIAR, 2016). No presente estudo o experimento realizado avaliou o tempo necessário para que a formulação se destacasse da mucosa em ambiente contendo elevada quantidade de saliva artificial e sob constante agitação para mimetizar o fluxo salivar (Figura 34).

Figura 34 - Filme de goma de celulose aderido à mucosa jugal de suíno.



Fonte: Dados da pesquisa.

Os resultados de tempo de mucoadesão obtidos para os filmes estão expostos na tabela 11.

Tabela 11 - Tempo de mucoadesão obtido para os filmes de goma de celulose e CMC.

Lote	Base (%)	Tempo de mucoadesão (min) ± DP
LB11	Goma de Cel. 1,8	94,04 ± 2,08
LB6	Goma de Cel. 2,4	96,12 ± 1,97
LB12	Goma de Cel. 3,0	91,16 ± 2,66
LB13	CMC 0,6	75,09 ± 3,41
LB10	CMC 0,8	71,36 ± 3,69
LB14	CMC 1,0	72,37 ± 2,10

Legenda: DP= desvio padrão, Goma de cel.=Goma de celulose.

Fonte: Dados da pesquisa.

Diante dos resultados, pode-se concluir que não houve diferença significativa no tempo de destacamento entre as formulações de filmes em suas diferentes concentrações, 1,8; 2,4 e 3,0 % para os filmes de goma de celulose e 0,6; 0,8 e 1,0 % para os de CMC, contrariando os estudos que sugerem que, por haver uma maior possibilidade de interpenetração do polímero na mucosa, o aumento da concentração do polímero de propriedade mucoadesiva leva ao aumento da mucoadesão, (AGUIAR, 2016).

É possível observar também que os filmes de goma de celulose apresentaram maior tempo de mucoadesão quando comparados aos filmes de CMC, sendo o lote LB6 de tempo máximo, 96,12 minutos ($\pm 1,97$), enquanto o lote LB10 o de menor tempo de aderência, 71,36 minutos ($\pm 3,69$).

A avaliação da mucoadesão é um processo complexo, por isso, comumente os ensaios de tempo e força são utilizados de maneira complementar, a fim de somar os resultados e compreender melhor o desempenho dos sistemas (SOUSA, 2018). Porém, alguns pesquisadores afirmam que os resultados desses estudos costumam ser complementares (ABRUZZO et al., 2012; MEHER et al., 2013).

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que os parâmetros de controle aplicáveis ao extrato de *T. occidentalis* L. atenderam às especificações de qualidade. Quanto ao extrato seco obtido, foi possível caracterizá-lo quanto ao teor de substâncias voláteis, tamanho de suas partículas, FT-IR e TG.

Os extratos foram avaliados em variadas concentrações quanto a suas propriedades inibitórias contra cepas de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, ambos apresentando resultados satisfatórios, demonstrando a possibilidade de utilização destes para tal atividade farmacológica.

Foi desenvolvido e validado um método espectrofotométrico, seguindo os critérios da RDC 166 de 2017, para determinação quantitativa de flavonoides totais do extrato etanólico de *T. occidentalis*, expressos em quercetina.

A partir destes resultados, propôs-se a obtenção de alguns lotes de filmes mucoadesivos para incorporação dos extratos de *T. occidentalis*, visando uma forma alternativa para o tratamento da candidíase oral. Obtiveram-se filmes a partir de uma variação qualitativa de quatro polímeros mucoadesivos, sendo a goma de celulose e carboximetilcelulose os que apresentaram melhores resultados para o extrato seco e para o extrato etanólico, respectivamente, e que, portanto, foram escolhidos para uma variação quantitativa na concentração do polímero.

Os controles de qualidade: peso médio, espessura, tempo de desintegração, índice de intumescimento e tempo de mucoadesão foram realizados para cada uma das formulações. A partir desses resultados experimentais, principalmente dos dois últimos citados, foi possível concluir que a variação no percentual dos polímeros na formulação, apesar de aumentar significativamente o índice de intumescimento, não foi significativa na avaliação da mucoadesão, sendo este o principal parâmetro para escolha das melhores formulações.

Diante do exposto, conclui-se que utilizar extratos da espécie *T. occidentalis* como ativo em filmes mucoadesivos à base de goma de celulose e carboximetilcelulose pode ser uma proposta promissora para desenvolvimento na área farmacêutica, contando também com o apoio das iniciativas públicas no sentido da ampliação do mercado fitoterápico no Brasil.

5.1 PERSPECTIVAS

- Desenvolver e validar um método para o doseamento da forma farmacêutica obtida;
- Desenvolver e validar um método de análise do perfil de liberação *in vitro* da forma farmacêutica obtida;
- Realizar o estudo de sensibilidade antifúngica *in vitro* das formulações obtidas, a fim de comparar com as respostas já obtidas para os extratos;
- Realizar, segundo a RDC Nº 318 de 2019, o estudo de estabilidade dos melhores lotes obtidos;
- Elaborar e depositar o pedido de patente da forma farmacêutica obtida ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI).

REFERÊNCIAS

- ABRUZZO, A. et al. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 1, p. 581–588, 2012.
- AGUIAR, M. M. G. B. de. **Obtenção de Gel mucoadesivo de nistatina para o tratamento da Candidiase oral. Desenvolvimento e caracterização de dispersões sólidas de nistatina**. 231 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São paulo, 2016.
- AKKOL, E. K. et al. *Thuja occidentalis* L. and its active compound, α -thujone: Promising effects in the treatment of polycystic ovary syndrome without inducing osteoporosis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 25–30, 2015.
- ALMEIDA, N.M.G; LOPES, T.J; CHAUD, M.V. Desenvolvimento de uma formulação de cloridrato de metoclopramida sob a forma de filme hidrogelatinoso Development of a metoclopramide hydrochloride formulation in a water soluble membrane. **Rev. Bras. Farm**, v. 93, n. 1, p. 114–119, 2012.
- ALOPAEUS, J. F. et al. Mucoadhesive buccal films based on a graft co-polymer – A mucin-retentive hydrogel scaffold. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 142, n. July 2019, 2020.
- ALVES, L. D. S. et al. *Thuja occidentalis* L. (Cupressaceae): Review of botanical, phyto-chemical, pharmacological and toxicological aspects. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 4, p. 1163–1177, 2014.
- ALVES, L.D.S. ***Thuja occidentalis* Linn (Cupressaceae): da droga vegetal a forma farmacêutica semissólida para o tratamento HPV**. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.
- ANDRADE, F.A. **Atividade de compostos naturais e sintéticos na presença de espécies de *Candida***. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-hospedeiro) - Univerisade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
- ANDREOLA, P. et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 45, n. 4, p. 219–226, 2016.
- ANSARI, M.; SADARANI, B.; MAJUMDAR, A. Optimization and evaluation of mucoadhesive buccal films loaded with resveratrol. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 44, p. 278–288, 2018.
- ARENDORF, T. M.; WALKER, D. M. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. **Archives of Oral Biology**, v. 25, n. 1, p. 1–10, 1980.
- ASLANI, N. et al. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of *Candida* species isolated from dental plaques. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 28, n. 3, p. 433–436, 2018.

AXELL, T. et al. A proposal for reclassification of oral candidosis. **Guest editorial**, v. 84, n. 2, p. 111–112, 1997.

BADKE, M.R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v. 15, n. 1, p. 132–139, 2011.

BARROCO, A.L.S. **Medicamentos pediátricos: novas formas farmacêuticas, formulações e dispositivos**. 91 f. Dissertação (Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, 2013.

BÍBLIA, N. T. Romanos. In BÍBLIA. Português. **Bíblia Sagrada: Almeida revisada e atualizada**. Tradução de João Ferreira de Almeida. São Paulo: Sociedade Bíblica do Brasil, 2017. p. 762.

BODINI, R.B. **Desenvolvimento de filmes de desintegração oral incorporados com os extratos de erva baleeira (*Cordia verbenacea*) e cúrcuma (*Curcuma longa*)**. 170 f. Tese (Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos) - Universidade de São Paulo, 2015.

BORGES, A.F. et al. Oral films: Current status and future perspectives: I-Galenical development and quality attributes. **Journal of Controlled Release**, v. 206, p. 1–19, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**, 8ª ed, v. 23, n. 1, p. 1-58, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº. 48, de 16 de Março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE Nº 88, de 16 de Março de 2004. Dispõe sobre a lista de referências bibliográficas para a avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE Nº 89, de 16 de Março de 2004 (Revogada pela Instrução Normativa nº 05 de 11 de dezembro de 2008). **Diário Oficial União**, Brasília, DF, p. 12, 2004c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE Nº 90, de 16 de Março de 2004 (Revogada pela Resolução - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 1–4, 2004d.

BRASIL. Decreto no 5.813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 71, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, p. 1–19, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria interministerial Nº 2.960, de 9 de Dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, p. 1–3, 2008.

BRASIL. **Farmacopeia Homeopática Brasileira** 3ª edição. São Paulo, v. 1, n. 3, p. 364, 2011.

BRASIL. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, v. 2017, p. 22, 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, 6. ed, v. 1, p. 1-985, 2019.

CALIXTO, J.B. O papel dos produtos naturais na descoberta moderna de medicamentos. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v. 91, n. 3, p. 1–7, 2019.

CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. **Antifungals. Biochemical Pharmacology**. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006295216304221>>. Acesso em 16 março de 2019.

CARVALHO, A.C.B. et al. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, n. October 2017, p. 29–35, 2018.

CASTELLÓN, M.A. et al. Obtenção e controle de qualidade de tintura-mãe de *Thuja occidentalis*. **Pesquisa homeopática**, v. 15, n. 1, p. 67–75, 2000.

CASTRO, I.M.N. de et al. Comparação da atividade de antifúngicos imidazólicos e triazólicos frente a *Candida albicans*. **Revista RBAC**, v. 48, n. 3, p. 1–10, 2016.

CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L.F.D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de tinturas de produtos naturais sobre *Candida* spp. **Int J Dent**, v. 10, n.1, p. 15–19, 2011.

CHANDA, W. et al. The potential management of oral candidiasis using anti-biofilm therapies. **Medical Hypotheses**, v. 106, p 15 – 18, 2017.

CHANG, L.C. et al. Bioactive constituents of *Thuja occidentalis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 9, p. 1235–1238, 2000.

CORDEIRO, M.S.F. **Aplicação de novo sistema polimérico mucoadesivo para liberação prolongada de pilocarpina**. 2015. 144 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

COSTA, I. de M. **Estudo de pré-formulação com o composto fenólico quercetina**. 2005. 198 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2005.

COUTO, R. O. **Desenvolvimento de filmes mucoadesivos para liberação de fármacos anestésicos na cavidade bucal**. 2015. 93 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão preto, 2015.

DAVID, J.P.L.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J.M. Produtos Fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria , um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v. 16, n. 9, p. 71–76, 2004.

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

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

EDWARDS, D. R.; DIXON, M. A. Mechanisms of drought response in *Thuja occidentalis* L. I. Water stress conditioning and osmotic adjustment. **Tree Physiology**, v. 15, n. 2, p. 121–127, 1995.

ELEFTHERIADIS, G. K. et al. Unidirectional drug release from 3D printed mucoadhesive buccal films using FDM technology: *In vitro* and *ex vivo* evaluation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 144, n. September, p. 180–192, 2019.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 9.ed. Strasbourg: **Council of Europe**, 2017.

FAVACHO, H.A.S. **Desenvolvimento de comprimidos com propriedades mucoadesivas contendo anestésicos para aplicação bucal**. 2018. 54 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão preto, 2018.

FIGUEIRÊDO, C. et al. Physical-Chemical characterization, anatomical and seasonal evaluation of *Thuja occidentalis* L.(cumpressaceae). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 5, p. 1721–1731, 2014.

FIGUEREDO, C. A. de; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: Construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

FREIRE, J. C. P. et al. Atividade antifungica de fitoterápicos sobre candidose oral : uma revisão de literatura. **Salusvita**, v. 35, n. 4, p. 537–546, 2016.

GARSUCH, V.; BREITKREUTZ, J. Novel analytical methods for the characterization of oral wafers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 195–201, 2009.

GARSUCH, V.; BREITKREUTZ, J. Comparative investigations on different polymers for the preparation of fast-dissolving oral films. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 539–545, 2010.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI, T. I. E. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225–234, 2010.

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M. b. Levantamento de extratos vegetais com ação anticândida no período de 2005-2013. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 175–185, 2015.

GOULART, L. S. et al. Oral colonization by *Candida* species in HIV-positive patients: association and antifungal susceptibility study. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 16, n. 3, p. 1-6, 2018.

GOUVÊA-MONDIN, M. E. B. Colonização da cavidade bucal de crianças por *Candida* spp . – papel na etiologia da cárie dentária. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 23, n. 4, p. 315–326, 2005.

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKE, C. **PDR for Herbal Medicines**. 2000. Disponível em: <https://www.academia.edu/7210476/PDR_HERBAL_MEDICINES>. Acesso em 17 Dezembro 2019.

HEBECKER, B. et al. Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 12, n. 7, p. 867–879, 2014.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149–169, 2016.

JAHAN, N. et al. Antimicrobial screening of some medicinal plants of Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 6, p. 4281–4284, 2010.

JASUJA, N. D. et al. Essential Oil and Important Activities of *Thuja orientalis* and *Thuja occidentalis*. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 18, n. 4, p. 931–949, 2015.

KHUDA-BUKHSH, A. R. et al. Thujone-rich fraction of *Thuja occidentalis* demonstrates major anti-cancer potentials: Evidences from in vitro studies on A375 cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2011, 2011, 16p.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: Um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.

KRAISIT, P. et al. Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 34–43, 2018.

KUMAR, A.; JHA, A. Antifungals Used Against Candidiasis. **Anticandidal Agents**, p. 11–39, 2017.

LI, J. H.; XIANG, Q. P. Phylogeny and biogeography of *Thuja L.* (Cupressaceae), an eastern Asian and North American disjunct genus. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 47, n. 6, p. 651–659, 2005.

LI, X. et al. Mucoadhesive buccal films of tramadol for effective pain management. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 67, n. 3, p. 231–237, 2017.

LIMA, I. de O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197–201, 2006.

LYRA, M.A.M. **Desenvolvimento de forma farmacêutica granulada efervescente à base de extratos de *Bauhinia forficata* Link para obtenção de uma associação-dose-fixa como alternativa no tratamento do diabetes melittus.** 2013. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

MABRY, T. j; MARKHAM, K.; THOMAS, M. . The systematic identification of flavonoids. **The Quarterly Review of Biology**, v. 45, n. 4, p. 51–2, 1970.

MARTO, J.; SALGADO, A.; ALMEIDA, A. Formas sólidas alternativas para administração oral em pediatria. **Port Farmacoter**, v. 3, p. 154–164, 2011.

MASHRU, R. C. et al. Development and Evaluation of Fast-Dissolving Film of Salbutamol Sulphate. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, n. 1, p. 25–34, 2005.

MEHER, J. G. et al. Development and characterization of cellulose-polymethacrylate mucoadhesive film for buccal delivery of carvedilol. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, n. 1, p. 172–180, 2013.

MILLSOP, J.W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487–494, 2016.

MIRANDA-CADENA, K. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, n. February, p. 100–107, 2018.

NAMI, S. et al. Current antifungal drugs and immunotherapeutic approaches as promising strategies to treatment of fungal diseases. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 110, n. December 2018, p. 857–868, 2019.

NASER, B. et al. *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A review of its pharmaceutical, pharmacological and clinical properties. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 69–78, 2005.

NGO, L.T. et al. 21 st Century Natural Product Research and Drug Development e medicamentos tradicionais. **Natural Product Reposts**, v. 30, n. 4, p. 1–15, 2013.

NUNES, K.M. et al. Padronização da tintura de *Calendula officinalis* L. para seu emprego em formulações semi-sólidas fitoterápicas. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 3, p. 344–350, 2009.

O'DONNELL, L.E. et al. Polymicrobial *Candida* biofilms: friends and foe in the oral cavity. **FEMS yeast research**, v. 15, n. 7, p. 1–14, 2015.

PÁDUA, M.S. et al. Assessment of antimicrobial activity in vitro of ethanolic extracts of *Banisteriopsis anisandra* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 3, p. 431–437, 2013.

PATEL, V.F.; LIU, F.; BROWN, M.B. Advances in oral transmucosal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 153, n. 2, p. 106–116, 2011.

PEIXOTO, J.V. et al. Candidíase: uma revisão de literatura. **Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75–82, 2014.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 586–591, 2012.

PEREIRA, J.A. **Atividade antifúngica do geraniol sobre leveduras multirresistentes do gênero *Cândida* e perfil farmacológico e toxicológico em estudo in silico**. 2017. 98 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais Sintéticos e Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

PEREIRINHA, P. R. R.; FIGUEIRAS, A. R. R. Desenvolvimento de sistemas mucoadesivos para a administração controlada de fármacos. **Boletim Informativo Geum**, v. 4, n. 1, p. 7–15, 2014.

PERFEITO, J. P. S. **O registro sanitário de medicamentos fitoterápicos no Brasil: uma avaliação da situação atual e das razões de indeferimento Brasília**. 2012. 163 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

PERIOLI, L. et al. Novel mucoadhesive buccal formulation containing metronidazole for the treatment of periodontal disease. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 3, p. 521–533, 2004.

PILZ, C.; CARRARD, V. C. **Candidiase Bucal. Regula SUS, 2015**. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/tsrs/telessauders/documentos/protocolos_resumos/estomatologia_resumo_clinico_candidiase_TSRS.pdf>. Acesso em: 20 setembro 2019.

PIZZOL, C. **Desenvolvimento de comprimidos mucoadesivos contendo extrato de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. (Macela)**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

ROSA, T. A. Desenvolvimento de métodos para avaliação da estabilidade química e física de antirretrovirais. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 23, p. 109, 2019.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. Handbook of Pharmaceutical Excipients. **The Pharmaceutical Press**, v. 9 ed, 2009, 917p.

RUSSO, E. et al. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 32, p. 113–125, 2016.

SAVI, P.D.R.S. et al. Análise de flavonoides totais presentes em algumas frutas e hortaliças convencionais e orgânicas mais consumidas na região sul do Brasil. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 12, n. 1, p. 275–288, 2017.

SAVICKI, C. et al. Characterization of carboplatin loaded micro-nanostructured porous granular material in a biphasic calcium phosphate ceramic system. **Revista Materia**, v. 24, n. 1, 2019. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/333221983>. Acesso em 15 Novembro 2019.

SILVA, C.C.A.R. **Obtenção de forma farmacêutica sólida (comprimido) à base de *Syzygium cumini* (L.) Skeels como alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por microrganismos**. 2019. 157 f. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, C.M. **Candidemia em neonatos: epidemiologia, perfil de susceptibilidade antifúngica e avaliação dos fatores de virulência dos agentes etiológicos**. 2015. 120 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.

SILVA, P.C.D. **Estudo de desenvolvimento de comprimidos de liberação imediata em associação dose fixa para o tratamento de filaríose**. 2019. 249 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

SILVA, P.D.C. **Desenvolvimento e validação do método analítico dos produtos intermediários e estudo de estabilidade preliminar de gel de *Thuja occidentalis* Linn . (Cupressaceae) para terapia antiviral**. 2016. 133 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

SILVA, R.S.; OLIVEIRA, K.M.S.; CAVALCANTE, G.M. Atividade antifúngica de *Sideroxylon obtusifolium* frente a diferentes espécies de *Candida sp*. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 1, p. 95, 2017.

SIMÕES, V.N. et al. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 495–501, 2013.

SINGH, A. et al. Oral candidiasis: An overview. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 18, n. 5, p. 81–85, 2014.

SOUSA, H.M.X. **Filmes mucoadesivos à base de quitosana e pectina contendo anestésicos locais : avaliação da permeação e mucoadesão in vitro visando aplicação tópica em odontologia**. 2015. 55 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2018.

- SOUSA, A.M.C. **A Importância do Xilitol na Prevenção da Cárie Dentária**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.
- SPEER, I.; PREIS, M.; BREITKREUTZ, J. Dissolution testing of oral film preparations: Experimental comparison of compendial and non-compendial methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 561, n. February, p. 124–134, 2019.
- SPOHR, C.G. **Atividade antifúngica de extrato fluido de *Impatiens walleriana hook. f.* e *Catharanthus Roseus (L.) G. Don.*** 2013. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2013.
- SQUIER, C. A.; KREMER, M. J. Biology of oral mucosa and esophagus. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 52242, n. 29, p. 7–15, 2001.
- STANGERLIN, D.M. et al. Sistemas de cultivo e custo de produção de *Thuja occidentalis* L. e *Thuja orientalis* L. em quatro municípios do estado do rio grande do sul. **Rev. SBAU**, Piracicaba, p. 98–109, 2008.
- TARÇIN, B. G. Oral Candidosis: Aetiology, Clinical Manifestations, Diagnosis and Management Derleme / Review. **Journal of Marmara University Institute of Health Sciences**, v. 1, n. 22, p. 140–148, 2011.
- TARDELLI, E. R. **Desenvolvimento de pré-formulação de mucoadesivo bucal como carreador de fármaco**. 2010. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Sorocaba, Sorocaba, 2010.
- TEJADA, G. et al. Formulation and in-vitro efficacy of antifungal mucoadhesive polymeric matrices for the delivery of miconazole nitrate. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 140–150, 2017.
- TINI, I. R. P. **Efeito do flavonoide quercetina extraído do bulbo de cebola roxa (*Allium cepa*) na biomodulação da linhagem celular HEP-2**. 2013. 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2013.
- TSIRI, D. et al. Chemosystematic value of the essential oil composition of *Thuja species* cultivated in poland-antimicrobial activity. **Molecules**, v. 14, n. 11, p. 4707–4715, 2009.
- VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. A potencial contribuição dos produtos naturais da biodiversidade brasileira para a bioeconomia. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 1–15, 2018.
- VESES, V.; GOW, N. A. R. Pseudohypha budding patterns of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 47, n. 3, p. 268–275, 2009.
- VILA, T. et al. Miltefosine inhibits *Candida albicans* and non-albicans *Candida* spp. biofilms and impairs the dispersion of infectious cells. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 1, p. 512–520, 2016.

ANEXO A - TRABALHO APRESENTADO NO 9TH INTERNATIONAL PHYTCOSMETICS AND PHYTOTHERAPY CONGRESS.

