

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BACHARELADO EM BIOMEDICINA

MARIA CAROLINA FERNANDES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME MUCOADESIVO
BUCAL CONTENDO EXTRATO DE *MORUS NIGRA* L. PARA TRATAMENTO
DE SINTOMAS CLIMATÉRICOS

JOÃO PESSOA

2023

MARIA CAROLINA FERNANDES DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME MUCOADESIVO
BUCAL CONTENDO EXTRATO DE *MORUS NIGRA* L. PARA TRATAMENTO
DE SINTOMAS CLIMATÉRICOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de bacharel em Biomedicina,
Universidade Federal da Paraíba

Orientador: Prof. Paulo Rogério Ferreti Bonan

JOÃO PESSOA

2023

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S237d Santos, Maria Carolina Fernandes dos.
Desenvolvimento e caracterização de filme
mucoadesivo bucal contendo extrato de Morus Nigra L.
para tratamento de sintomas climatéricos / Maria
Carolina Fernandes dos Santos. - João Pessoa, 2023.
35 f. : il.

Orientação: Paulo Rogério Ferreti Bonan.
TCC (Graduação) - UFPB/CCS.

1. Climatério. 2. Filme Mucoadesivo. 3. Morus nigra.
I. Bonan, Paulo Rogério Ferreti. II. Título.

UFPB/CCS CDU 612.67(043.2)

MARIA CAROLINA FERNANDES DOS SANTOS

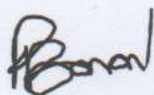
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME MUCOADESIVO
BUCAL CONTENDO EXTRATO DE *MORUS NIGRA* L. PARA TRATAMENTO
DE SINTOMAS CLIMATÉRICOS

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de bacharel em Biomedicina,
Universidade Federal da Paraíba

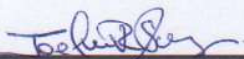
Aprovada em

02/06/2023

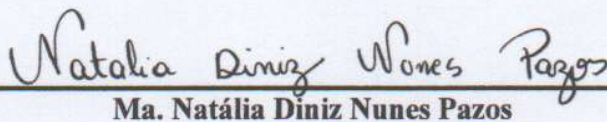
BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Paulo Rogério Ferreti Bonan
Universidade Federal da Paraíba



Prof. Dra. Joelma Rodrigues de Souza
Universidade Federal da Paraíba



Ma. Natália Diniz Nunes Pazos

DEDICATÓRIA

ao meu avô Lucas Fernandes de Souza *in
memorian*, que certamente está comemorando este
dia conosco lá do céu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por esta conquista alcançada em meio a tantos conflitos e inseguranças internas e externas. Sou muito grata por este momento e por ter me decidido por este caminho que está apenas começando.

Agradeço aos meus pais, Sérgio e Vilma, que sempre fizeram de tudo por minha educação e por mim em todos os sentidos. Se sou quem sou hoje, é por causa da boa educação, do apoio incondicional e de todo amor que sempre me deram.

Agradeço aos meus irmãos, João Victor e Filipe, por sempre me apoiarem e acreditarem em mim e nos meus sonhos.

Agradeço ao meu namorado, Gustavo, que sempre me incentivou e nunca deixou que eu duvidasse da minha capacidade de alcançar os meus objetivos.

Agradeço aos meus padrinhos Genetone e Aparecida por sempre torcerem por mim e estendo esse agradecimento também a todas as minhas tias e tios queridos com quem sempre posso contar e sempre dividi momentos especiais.

Agradeço a todas as minhas primas e primos com quem sempre divido risadas e muitos cafés, mesmo que Catarina só tome nescafé e Edy e Joyce coloquem água no café antes de beber.

Agradeço aos meus amigos Luiza, Alan e Malu, com os quais dividi toda as alegrias e estresses da graduação. Especialmente a Luiza, com quem passei mais horas do que com minha família nesses 5 anos.

Agradeço aos meus colegas de curso que foram fundamentais para que eu conseguisse levar com mais tranquilidade esses anos de UFPB.

Agradeço a todos os que estiveram comigo em experimentos nesse início de carreira científica: Alan, Luiza, Malu, Natália, Júnior, Isis Muniz, Vanessa e Panmella.

Agradeço ao meu orientador Paulo Rogério Ferreti Bonan que confiou em mim desde o começo para executar este e tantos outros projetos.

Agradeço a todos os professores que passaram por mim durante esses anos. Apreendi com grande parte de vocês não só sobre carreira acadêmica, mas como ser humana e empática comigo e com os outros.

Agradeço a todos os pacientes que passaram por mim durante esta formação, especialmente os do LACEN Municipal, onde tive autonomia para recebê-los como meus pacientes.

EPÍGRAFE

Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.
(Antonio Medeiros)

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE FILME MUCOADESIVO BUCAL CONTENDO EXTRATO DE *MORUS NIGRA* L. PARA TRATAMENTO DE SINTOMAS CLIMATÉRICOS

RESUMO

A síndrome do climatério representa o conjunto de sinais e sintomas que ocorrem neste período e diminuem a qualidade de vida das pessoas com útero. Por ser caracterizada pela diminuição na produção do hormônio estrogênio, a terapia de reposição hormonal (TH) com o estrogênio é o seu tratamento padrão ouro. No entanto, devido a TH ser contraindicada para algumas pessoas, alternativas como o tratamento com fitoestrogênios podem contribuir como a terapêutica para a redução dos sinais e sintomas. Dentre as fontes de fitoestrogênios mais utilizadas, destaca-se a *Morus nigra*, que tradicionalmente é consumida através da infusão das folhas ou pó das folhas. Desta forma, a fim de explorar novas formas de administração para fitoestrogênios, este trabalho buscou desenvolver um filme mucoadesivo bucal contendo o extrato hidroalcólico das folhas da *M. nigra* para a redução dos sintomas climatéricos. O filme foi produzido com duas diferentes concentrações (C1 e C2) através da técnica de casting e evaporação do solvente com matriz polimérica baseada em HPMC e glicerol. A caracterização realizada através de FTIR e DSC, teste de resistência dobrável e medição de pH de superfície apresentou boas características macroscópicas e propriedades físico-químicas favoráveis ao uso do filme na mucosa bucal. A liberação *in vitro* do extrato dos filmes foi crescente e sustentada por 6h para o filme C1 e 8h para o filme C2. A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio de viabilidade celular por MTT e demonstrou que os filmes não foram citotóxicos para células Vero. Desta forma, este trabalho produziu e caracterizou com sucesso filmes mucoadesivos bucais para o tratamento de sintomas climatéricos com liberação do extrato *in vitro* sustentada entre 6 e 8h e sem efeitos citotóxicos em células Vero.

Palavras chave: Climatério; Filme Mucoadesivo; *Morus nigra*

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF BUCCAL
MUCOADHESIVE FILM CONTAINING *MORUS NIGRA L.* EXTRACT FOR
TREATMENT OF CLIMATERIC SYMPTOMS

ABSTRACT

The climacteric syndrome represents the set of signs and symptoms that occur in this period and reduce the quality of life of people with a uterus. Because it is characterized by a decrease in the production of the hormone estrogen, hormone replacement therapy (HT) with estrogen is its gold standard treatment. However, because HT is contraindicated for some people, alternatives such as treatment with phytoestrogens can contribute as a therapy to reduce signs and symptoms. Among the most used sources of phytoestrogens, *Morus nigra* stands out, which is traditionally consumed through the infusion of leaves or leaf powder. Thus, in order to explore new forms of administration for phytoestrogens, this work sought to develop a buccal mucoadhesive film containing the hydroalcoholic extract of *M. nigra* leaves to reduce climacteric symptoms. The film was produced with two different concentrations (C1 and C2) through the technique of casting and solvent evaporation with a polymeric matrix based on HPMC and glycerol. The characterization performed through FTIR and DSC, folding resistance test and surface pH medication showed good macroscopic characteristics and physicochemical properties favorable to the use of the film on the buccal mucosa. The in vitro release of the film extract was increasing and sustained for 6h for the C1 film and 8h for the C2 film. Cytotoxicity was assessed using the MTT cell viability assay and demonstrated that the films were not cytotoxic to Vero cells. Thus, this work successfully produced and characterized buccal mucoadhesive films for the treatment of climacteric symptoms with in vitro extract release sustained between 6 and 8h and without cytotoxic effects on Vero cells.

Keywords: Climacteric; Mucoadhesive Film; *Morus nigra*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida da pessoa com útero	14
Figura 2 – Folhas da <i>Morus nigra</i>	18
Figura 3 – Estrutura do beta-estradiol e principais fitoestrogênios da <i>Morus nigra</i>	18
Figura 4 – Produção dos Filmes de amora.....	21
Figura 5 – Esquema de dobramento dos filmes.....	22
Figura 6 – Aspecto visual dos Filmes de amora.....	25
Figura 7 – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier das amostras C1, C2 e Co.....	27
Figura 8 –Termograma de C1, C2 e Co entre 20 e 200°C (A) e entre 25 e 40°C (B).....	28
Figura 9 – Liberação do extrato de amora.....	29

GRÁFICOS

Gráfico 1 – pH de superfície das amostras Co, C1 e C2.....	26
Gráfico 2 – Viabilidade celular por MTT em células Vero.....	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	13
2.1.CLIMATÉRIO.....	13
2.2.TRATAMENTO DOS SINTOMAS ASSOCIADOS AO CLIMATÉRIO.....	15
2.3.ESTROGÊNIOS E FITOESTROGÊNIOS.....	16
2.4. <i>MORUS NIGRA</i> L. E AÇÃO FITOESTROGÊNICA.....	17
2.5.FILMES MUCOADESIVOS.....	19
3. OBJETIVOS.....	20
3.1.OBJETIVO GERAL.....	20
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1.PRODUÇÃO DOS FILMES MUCOADESIVOS.....	21
4.2.CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE AMORA.....	22
4.2.1. Aspecto visual dos filmes de amora.....	22
4.2.2. Resistência dobrável.....	22
4.2.3. PH de superfície.....	23
4.2.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	23
4.2.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	23
4.3.ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	23
4.4.ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	24
4.4.1. Cultivo Celular.....	24
4.4.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1.CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE AMORA.....	25
5.1.1. Aspecto visual do filme de amora.....	25
5.1.2. Resistência dobrável.....	25
5.1.3. PH de superfície.....	26

5.1.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	27
5.1.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	28
5.2. ENSAIO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	28
5.3. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	29
5.3.1. Análise de viabilidade celular por MTT em células Vero.....	29
6. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

O climatério é definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma fase biológica da vida, e não uma doença, que compreende a transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo (pós menopausa) da pessoa com útero. A menopausa, que reflete a perda da função folicular ovariana, é um marco temporal dessa fase, correspondendo ao último ciclo menstrual, e reconhecida retrospectivamente como a última menstruação seguida de 12 meses de amenorreia (BRASIL,2008; SHIFREN et al., 2014). O período entre 5 a 10 anos anteriores à menopausa é definido como perimenopausa e dá início ao climatério, que se inicia com esta data e se estende até depois da menopausa, no período de pós menopausa (BRASIL,2008).

O climatério traz alterações significativas na qualidade de vida de pessoas com útero, com o aparecimento de sinais e sintomas que caracterizam a síndrome do climatério como as complicações vasomotoras, sintomas psicológicos e cognitivos, dores musculares e diminuição da libido (MINKIN, 2019). Segundo Assunção *et al.*, (2017) a intensidade destas alterações pode ser também influenciada por diversos fatores socioeconômicos, como baixa escolaridade, situação financeira, e presença ou não de companheiro fixo.

Por ocorrer devido a diminuição na produção do hormônio estrogênio e elevações nos níveis do hormônio folículo-estimulante (FSH), os sinais e sintomas que constituem a síndrome do climatério tem a terapia de reposição hormonal (TH) como tratamento padrão ouro. No entanto, devido a TH ser contraindicada para algumas pessoas como as anteriormente tratadas para cânceres hormônio-dependente e aquelas com histórico de eventos tromboembólicos, existem outras opções de tratamentos não-hormonais com outras classes de medicamentos (inibidores seletivos da recaptação de serotonina, norepinefrina, gabapentina) e Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS) como a ioga, a acupuntura e a fitoterapia (BRASIL,2008).

A fitoterapia atua no tratamento dos sintomas climatérios com o fornecimento de substratos com atividade semelhante a dos hormônios estrogênicos, mas utilizando medicamentos obtidos exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais, que por exercer atividades semelhantes às dos estrogênios endógenos, são denominados de fitoestrogênios (CECCARELLI et al., 2022; KUIPER et al., 1998; TURNER; AGATONOVIC-KUSTRIN; GLASS, 2007). Pesquisas dedicadas a fitoestrogênios naturais e seus análogos sintéticos sugerem que esses compostos podem estar ligados a

diminuição dos sintomas do climatério (YOSHIKATA et al., 2021) e menores riscos de doenças cardiovasculares, obesidade, síndrome metabólica, distúrbios da função cerebral e cânceres hormônio-dependentes (WANG et al., 2021) sendo, portanto, uma opção capaz de ser utilizada também por pessoas com contraindicação a TH.

As fontes de fitoestrogênios para a alimentação humana são variadas e, no Brasil, observa-se na medicina popular, a *Morus nigra* como uma planta com grande potencial de escolha (MIRANDA et al., 2010). Um ensaio clínico realizado, no estado do Maranhão por Costa *et al.* (2020) demonstra que o tratamento realizado em mulheres climatéricas com o pó das folhas da *Morus nigra* apresentou melhoras nos sintomas do climatério e na qualidade de vida de forma semelhante aos efeitos das mulheres climatéricas tratadas com a TH. Outros autores brasileiros também consagram a utilização da *Morus nigra* como alternativa para o tratamento dos sintomas climatéricos (SILVA et al., 2022; MIRANDA et al., 2020; PEREIRA, 2019; SILVA; SOUZA; CERQUEIRA, 2021). Sendo as principais formas de administração dos seus fitoestrogênios, o uso de infusão ou ingestão do pó das partes das plantas que possuem estes compostos (MIRANDA et al., 2010). Porém, estas formas de administração apresentam limitações que podem ser superadas com o uso de filmes aderidos a mucosa bucal, conhecido por sua potencial aplicação em formulações de liberação imediata e sustentada (SHINDE; GHONGE; KATHPALIA, 2022), escape da degradação enzimática do trato gastrointestinal, rápida absorção, ausência do metabolismo de primeira passagem e aumento da biodisponibilidade (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018).

Por isso, com a finalidade de explorar novas formas de administração e ampliar as possibilidades para o tratamento de sintomas climatéricos em pessoas com útero, este trabalho propõe a utilização de filmes mucoadesivos bucais para a administração de fitoestrogênios contidos no extrato hidroalcolico da *Morus nigra*.

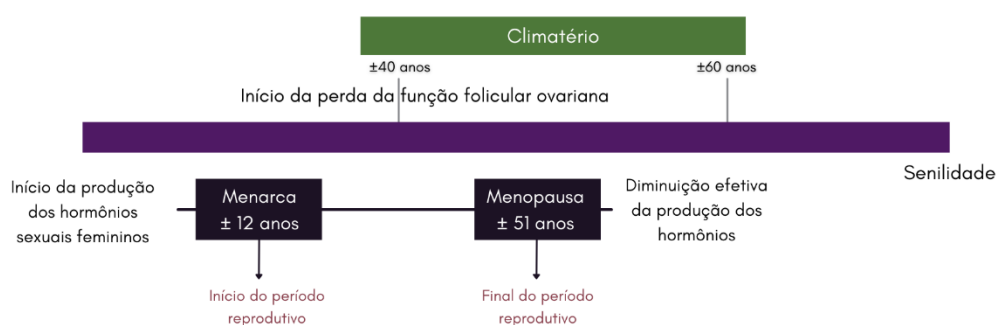
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. CLIMATÉRIO

As pessoas com útero passam aproximadamente um terço de suas vidas no climatério, o qual se inicia a partir da menopausa e que, por sua vez, ocorre por volta dos 51 anos de idade, estando representado na figura 1. Até o ano de 2030, estima-se que para a população mundial, 47 milhões de mulheres passarão pela menopausa a cada ano

(ABDELLA et al., 2022). Por isso, é importante considerarmos os riscos de manifestações clínicas agudas e transitórias como as doenças metabólicas e cardiovasculares que surgem durante a transição da menopausa. E além destas, outras manifestações ditas não transitórias e que ocorrem ainda entre 10 a 15 anos após a menopausa, como os fenômenos atrofícos geniturinários, distúrbios no metabolismo lipídico e ósseo (BRASIL, 2008) também são fatores influentes na qualidade de vida da pessoa com útero.

Figura 1 – Ciclo de vida da pessoa com útero



Fonte: Autor, 2023

Com essa divisão temporal entre o início dos sintomas transitórios e não transitórios, além dos sinais e sintomas já observados durante a perimenopausa, é possível oferecer maior qualidade de vida aos pacientes, através da prevenção e início de terapêutica adequada de acordo com o aparecimento das manifestações (LOBO; GOMPEL, 2022). É importante ressaltar que por ser um processo biológico não há o objetivo de cura e/ou reversão do climatério, mas sim, a redução de danos e agravos a saúde (WARD; DENERIS, 2018).

As manifestações decorrentes de alterações hormonais observadas no climatério são consequências de mudanças características no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HHG) (MIKHAEL; PUNJALA-PATEL; GAVRILOVA-JORDAN, 2019). Pelo envelhecimento natural, os folículos ovarianos diminuem em quantidade, causando a diminuição das células da granulosa, as quais produzem estrogênio e inibina. A diminuição da produção destes dois hormônios, diminui a inibição sobre a produção do hormônio folículo estimulante (FSH) e aumenta a sua quantidade, assim como a do hormônio luteinizante (LH), ambos hormônios hipofisários. A alteração na produção destes hormônios pela hipófise, interrompe o funcionamento do HHG e causa ciclos menstruais irregulares, até que parem completamente na menopausa. O LH e o FSH ficam

desinibidos e permanecem em níveis elevados anos após o início da menopausa (PEACOCK; KETVERTIS, 2022).

Essas alterações na produção hormonal, por sua vez, promovem o conjunto de sinais e sintomas que constituem a síndrome do climatério. Os principais sintomas relacionados a esta síndrome são sintomas vasomotores, síndrome geniturinária da menopausa (PETERS, 2021), diminuição da libido, padrões de sono perturbados (ŁLOPIEN et al., 2015), fadiga, alterações de humor, ansiedade, dores de cabeça, dificuldade de concentração e ganho de peso (SOUROUNI et al., 2021). A ocorrência destes está relacionada a diminuição da qualidade de vida dessas pessoas durante este período (ASSUNÇÃO et al., 2017; TAEBI et al., 2018).

2.2. TRATAMENTO DOS SINTOMAS ASSOCIADOS AO CLIMATÉRIO

Segundo a Sociedade Norte-Americana de Menopausa (GASS et al., 2012), a estratégia preventiva e terapêutica padrão para a menopausa deve ser a terapia de reposição hormonal (TH) por apontar que evidências atuais apoiam o uso da TH para mulheres na perimenopausa e pós-menopausa quando o equilíbrio de potenciais riscos e benefícios forem favoráveis à saúde de cada mulher, individualmente. Por sua vez, a dose ministrada deve ser a mínima eficaz para melhorar os sintomas, devendo ser interrompida assim que os benefícios desejados tenham sido alcançados ou os riscos superem os benefícios no tratamento (GASS et al., 2012; SHIFREN et al., 2014). Os riscos mais comuns e que apresentam contraindicação para TH são suspeita ou histórico de câncer de mama; história conhecida ou suspeita de câncer uterino; trombose venosa profunda (TVP) ativa ou história de TVP ou embolia pulmonar (EP); história de distúrbio de coagulação do sangue, sendo o mais comum portadores da mutação do Fator V de Leiden; histórico ou presença de doenças trombóticas arteriais, como infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral; doença ou disfunção hepática crônica e enxaqueca com aura (GASS et al., 2012; WANG-CHENG; ROSENFELD, 2022). De forma geral, a TH convencional pode incluir um componente de estrogênio e progesterona para mimetizar o funcionamento fisiológico anterior dos hormônios, mas também pode ser suficiente apenas com a reposição do estrogênio a depender das manifestações clínicas individuais (WANG-CHENG; ROSENFELD, 2022).

No caso de pacientes que não podem fazer uso de Terapia de Reposição Hormonal, deve-se utilizar outras opções terapêuticas não baseadas em hormônios como

outras classes de medicamentos ou terapias componentes das Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS) (BRASIL, 2008). Segundo Barra *et al.* (2014), algumas das Práticas Integrativas e Complementares em Saúde (PICS) como a ioga, a acupuntura e a fitoterapia podem trazer efeitos benéficos ao tratamento dos sintomas do climatério.

A literatura aborda de forma vasta o impacto da prática da ioga em mulheres após a menopausa (AFONSO *et al.*, 2012; SOLAKOGLU *et al.*, 2022; SUSANTI *et al.*, 2022), ressaltando que este método de baixo custo deve ser utilizado para melhorar a qualidade de vida e saúde dessas mulheres (SHARIFI; AFSHARI; BAHRI, 2021). Já em relação a acupuntura e práticas assemelhadas, os resultados são controversos e demonstram a necessidade de maior investigação nessa área (ZHONG *et al.*, 2022), pois alguns autores reforçam o seu uso (MA *et al.*, 2021; XIE *et al.*, 2021) e outros não recomendam (BORUD *et al.*, 2010; CHO; WHANG, 2009).

Por fim, tem-se o uso da fitoterapia através de componentes de plantas classificados como fitoestrogênios, os quais possuem atividade estrogênica, ou seja, podem se ligar aos receptores de estrogênio (ERs) e mimetizar algumas ações do estrogênio humano (TURNER; AGATONOVIC-KUSTRIN; GLASS, 2007). Uma revisão sistemática concluiu que o uso de produtos com fitoestrogênios, juntamente com a realização de exercícios físicos, tem um papel efetivo na melhora da qualidade de vida de mulheres na menopausa (TAEBI *et al.*, 2018). De forma geral, esses compostos são recomendados para mulheres com sintomas leves a moderados (TEMPFER *et al.*, 2007) e não promovem efeitos colaterais graves (CHEN; LIN; LIU, 2015).

2.3. ESTROGÊNIOS E FITOESTROGÊNIOS

Os estrogênios são os hormônios esteroides, objeto da terapia de reposição hormonal, que são derivados do colesterol e contém 18 átomos de carbono em sua estrutura. Dentre eles, o estradiol é o estrogênio mais indicado na terapêutica por apresentar melhor interação com os receptores de estrogênio e, por isso, é comumente utilizado em várias preparações para o tratamento de sintomas vasomotores moderados a graves e para a prevenção da osteoporose pós-menopausa (O'CONNELL, 1995; PROSSNITZ; BARTON, 2014; RUGGIERO; LIKIS, 2002).

Apesar de predominante, a produção de estrogênio não é restrita aos folículos ovarianos, ocorrendo também a produção não-gonadal (HEMSELL *et al.*, 1974). Isso

significa que além dos ovários, muitas outras estruturas podem ser capazes de produzir estrogênios como o cérebro, ossos, fígado, adrenais, pele e vasos sanguíneos (BARAKAT et al., 2016). Nos locais onde a produção de precursores de esteróides com a quantidade necessária de carbono não são suficientes, os substratos são obtidos de outros tecidos pela circulação sanguínea e, em seguida, convertidos em estrogênios pela enzima aromatase (CECCARELLI et al., 2022).

A fitoterapia é capaz de fornecer esses substratos através da administração de fitoestrogênios, os quais também podem atuar nos receptores estrogênicos, a depender de sua estrutura (CECCARELLI et al., 2022; KUIPER et al., 1998; TURNER; AGATONOVIC-KUSTRIN; GLASS, 2007). Os fitoestrogênios, utilizados para o tratamento dos sintomas associados ao climatério, são polifenóis não esteroides encontrados naturalmente em plantas que podem se ligar aos receptores de estrogênio (ERs) e mimetizar algumas ações do estrogênio humano através da ativação ou inativação de determinados genes regulados pelos ERs (SAYED; ELFIKY, 2018; TURNER; AGATONOVIC-KUSTRIN; GLASS, 2007). As principais classes de compostos retratados na literatura como fitoestrogênios são os flavonoides, as lignanas e os estilbenos (CECCARELLI et al., 2022; KUIPER et al., 1998) e as principais estruturas representantes são a genisteína, a daidzeína, a quercetina, a apigenina, o resveratrol, a biocianina A, a formonetina e o coumestrol (WANG et al., 2021). Outra característica notável desses fitoterápicos é a sua ação seletiva, sendo considerados Moduladores Seletivos dos Receptores Estrogênicos (SERMs), o que faz com que tais substâncias provoquem poucos efeitos colaterais, embora, possam exercer também ação antiestrogênica a depender da quantidade de hormônios circulantes no organismo (BRASIL, 2008). Segundo uma revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados com meta-análise, os fitoestrogênios parecem reduzir a frequência de ondas de calor em mulheres na menopausa, sem efeitos colaterais graves (CHEN; LIN; LIU, 2015).

2.4. *MORUS NIGRA* L. E AÇÃO FITOESTROGÊNICA

As fontes de fitoestrogênio para a alimentação humana são variadas e tem-se na *Morus nigra* L. um grande potencial de escolha. O gênero *Morus* é amplamente distribuído na Ásia, Europa, América do Norte, América do Sul e África e devido a sua capacidade de adaptação a diferentes climas e altitudes, a espécie *Morus nigra* pode ser considerada uma espécie cosmopolita como as demais do mesmo gênero (MINISTÉRIO

DA SAÚDE, 2015). No Brasil, essa espécie é conhecida popularmente como amora, amoreira, amoreira preta, amoreira negra ou amora miúra e teve seu cultivo iniciado no país com a migração japonesa no século IX. De forma geral, a parte da planta mais utilizada na medicina popular são as folhas (Figura 3) e os seus derivados, mas ainda não há monografias em farmacopeias oficiais para os derivados de *M. nigra* (BRASIL, 2015).

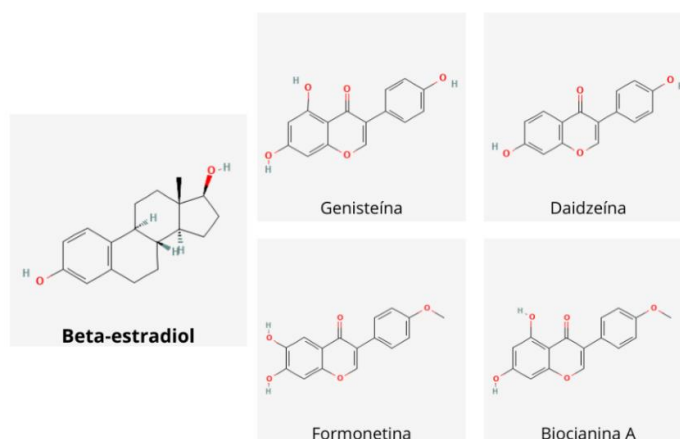
Figura 2 – Folhas da *Morus nigra*



Autoria: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

A amoreira preta pertence à família Moraceae e ao gênero *Morus*, no qual suas plantas contêm vários compostos fenólicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), sendo alguns destes, mais conhecidos por sua ação fitoestrogênica a exemplo da genisteína, daidzeína, biocianina A e formonetina que estão representadas na figura 2 (HAO et al., 2022; SAYED; ELFIKY, 2018).

Figura 3 – Estruturas do beta-estradiol e dos principais fitoestrogênios da *Morus nigra*.



Fonte: Autor, 2023

Essa espécie é bastante utilizada na medicina popular por pessoas com útero para substituir a terapêutica da reposição hormonal convencional no climatério (PADILHA et

al., 2010). As principais formas de administração oral dessa espécie são o chá (infusão) de folhas da amoreira preta (MIRANDA et al., 2010), assim como também as cápsulas com o pó das folhas (COSTA et al., 2020) e ambos trazem consigo resultados positivos para o tratamento dos sintomas climatéricos.

Segundo Ercisli e Orhan (2007), a amoreira preta apresenta maiores teores de compostos fenólicos (1422 mg equivalentes de ácido gálico/100g de matéria fresca) e flavonoides totais (276 mg de equivalentes de quercetina/100g de matéria fresca) que as demais espécies do gênero *Morus*, a amoreira branca (*Morus alba* L.) e a amoreira vermelha (*Morus rubra* L.). Além disso, a amoreira preta mostrou-se rica em antocianinas (11.3 mg/g) e flavonóis (0.7 mg/g), sendo este o principal motivo associado ao seu potencial anti-inflamatório e antioxidante (CHEN et al., 2018).

2.5.FILMES MUCOADESIVOS

Nos últimos anos, um interesse significativo tem sido demonstrado no desenvolvimento de filmes bucais mucoadesivos utilizando polímeros adesivos naturais ou sintéticos. A administração de fitoterápicos através da mucosa bucal já é estabelecida na literatura, sendo utilizada em abordagens anti-inflamatórias e/ou antimicrobianas (CHANAJ-KACZMAREK et al., 2021; PACZKOWSKA-WALENDOWSKA et al., 2021; RIDWAN et al., 2021; SCHMIDT et al., 2019), quimiopreventivas (ARANTES et al., 2021; DI PRIMA; CONIGLIARO; DE CARO, 2019) antiulcerogênica (AYOUB et al., 2021), antitumoral (TANGSUKSAN et al., 2021), entre outros. Já para a terapia de reposição hormonal, um filme bucoadesivo foi desenvolvido por Abdella *et al.* (2022) para liberação controlada de estradiol e seus resultados demonstraram que o filme bucoadesivo pode ser uma plataforma promissora para a entrega de estrogênios através da mucosa bucal para o tratamento dos sintomas da menopausa.

O uso dos filmes para a administração e liberação controlada de fármacos através da mucosa bucal é uma abordagem inovadora que traz benefícios tanto por aumentar a biodisponibilidade do fármaco administrado como por possibilitar uma maior adesão ao tratamento pelos pacientes (BALA et al., 2013). Características como tamanho reduzido, conforto, facilidade de aplicação, armazenamento, manuseio e a possibilidade de tomá-los sem ou com pouca água os tornam um sistema de entrega ideal para a maioria dos medicamentos (GALEY; LONSDALE; NACHT, 1976).

A administração transmucosa bucal é uma via não invasiva e simples para administração sistêmica de fármacos. Esta via oferece vantagens sobre outras vias de administração, como o rápido início de ação devido à sua rica vascularização, o escape da degradação enzimática do trato gastrointestinal, evitando o metabolismo de primeira passagem e possivelmente melhorando a biodisponibilidade do fármaco (FONSECA-SANTOS; CHORILLI, 2018). Além disso, a cavidade oral e a mucosa bucal são de fácil acesso, o que torna a aplicação e a remoção de um medicamento simples para o paciente ou cuidador (GILHOTRA et al., 2014; PERIOLI et al., 2004).

Dentre os principais materiais utilizados para produção destes filmes, o HPMC (Hidroxipropilmetilcelulose) destaca-se como um derivado da celulose capaz de formar filmes gelatinosos que hidratam e expandem em contato com a água, liberando o fármaco de maneira controlada (GUARVE; KRIPLANI, 2021). Além deste, o glicerol também é utilizado na produção de filmes como agente plastificante capaz de promover maior flexibilidade e hidratação de filmes mucoadesivos (COBOS et al., 2018; STACHOWIAK; KOWALONEK; KOZLOWSKA, 2020).

Desta forma, este trabalho desenvolveu um filme mucoadesivo bucal baseado em HPMC e glicerol para a liberação controlada do extrato hidroalcoólico das folhas de *Morus nigra* L. (filmes de amora) visando o tratamento dos sintomas relacionados ao climatério.

3. OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

- a) Desenvolver filmes poliméricos mucoadesivos para liberação do extrato hidroalcoólico 20% (p/v) das folhas de *Morus nigra* L. (filmes de amora).

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Produzir os Filmes de amora;
- b) Caracterizar físico-quimicamente os Filmes de amora;
- c) Realizar o ensaio liberação *in vitro* dos Filmes de amora;
- d) Avaliar citotoxicidade em células Vero expostas aos Filmes de amora.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PRODUÇÃO DOS FILMES DE AMORA

Os filmes poliméricos mucoadesivos foram preparados através do método de *casting* e evaporação do solvente (BOATENG et al., 2009) que consiste no preparo de uma solução, seguido de evaporação do solvente de fundição em estufa, de forma representada na figura 4.

Figura 4 – Produção dos Filmes de Amora



Fonte: Autoria própria, 2023

Foram utilizados o Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (Bandeirante Brazmo Química, Brasil) como agente filmógeno, o glicerol (Sigma-Aldrich, Brasil) como agente plastificante, água destilada (SS Plus, Brasil) como solvente e o extrato hidroalcoólico de folhas da *Morus nigra* L. 20% (p/v) (Ely Farma, Brasil) como agente fitoterápico.

Inicialmente, o HPMC (0,8% m/v) foi dissolvido em 90mL de água destilada sob agitação a temperatura de $\pm 50^{\circ}\text{C}$, permanecendo em repouso por 2 horas. Após esse período, o glicerol (0,15% v/v) foi adicionado à solução de HPMC sob agitação por 30 min. O extrato foi diluído em 10mL de água e adicionado à solução obtida, permanecendo em agitação durante 30 minutos. Em seguida, a solução foi colocada no dessecador

durante 24 horas, vazadas em placas de Petri de plástico e secadas na estufa 50°C. As concentrações de extratos utilizadas para o estudo foram CO – 0% (controle), C1 – 1,25% (v/v) e C2 – 2,5% (v/v) do extrato hidroalcólico das folhas de *M. nigra*. Sendo a C2, correspondente a concentração em miligramas utilizada no tratamento em forma de cápsulas do pó das folhas e C1, a metade deste valor.

4.2. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE AMORA

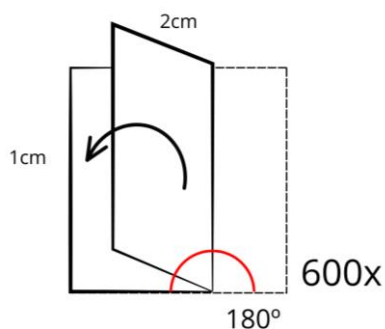
4.2.1. Aspecto visual dos filmes de amora

O aspecto visual do filme foi avaliado baseando-se nos critérios de homogeneidade, flexibilidade, uniformidade da cor e fragilidade.

4.2.2. Resistência dobrável

A resistência dobrável do filme foi verificada através do método de dobramento repetido em região especificada de cada filme (KARKI et al., 2016; SALEHI; BODDOHI, 2019). Os filmes foram cortados na dimensão 2 x 1 cm e a região de dobramento deverá formar um ângulo de 180° (figura 5).

Figura 5 – Esquema de dobramento dos filmes



Fonte: Autoria própria, 2023

O valor da resistência dobrável do filme foi determinado pelo número de vezes que cada fragmento pode ser dobrado em região específica sem quebrar. O ensaio foi realizado em triplicata, no qual cada amostra foi submetida a 600 repetições.

4.2.3. PH de superfície

O potencial hidrogeniônico (pH) da superfície dos filmes foi verificado empregando-se o método proposto por Salehi e Boddohi (2019) (SALEHI; BODDOHI, 2019). Inicialmente, os filmes foram cortados na dimensão 1 x 1 cm e mantidos em 5mL de água destilada por 10 min para aumentar de volume. O medidor de pH (PH700, Apera Instruments) foi utilizado para determinar o pH da superfície, o qual foi mensurado em triplicata, a partir da aposição da sonda de pH na superfície de cada filme permanecendo durante um minuto.

4.2.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando um espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier (IRPrestige-21, Shimadzu, Japão) com 64 varreduras e resolução de 4 cm^{-1} de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, na forma de filme. Os dados foram visualizados em gráficos plotados no Origin (OriginLab®).

4.2.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (Differential Scanning Calorimetry – DSC) foi utilizada para análise do perfil calorimétrico. As mensurações foram realizadas no analisador térmico SHIMADZU DSC 60 Plus mediante aquecimento das amostras numa taxa de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de 35°C a 200°C sob atmosfera gás argônio inerte, com vazão de gás de $50\text{mL}/\text{min}$. Os dados foram visualizados em gráficos plotados no Origin (OriginLab®).

4.3. ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O ensaio de liberação *in vitro* do extrato de *M. nigra* L. foi realizado individualmente para os filmes Co, C1 e C2. Para essa análise, os filmes foram cortados em pedaços de $1\times 2\text{ cm}$ e transferidos para tubos contendo 50 mL de PBS (pH 6,8). Em intervalos de tempo predeterminados de 1h, 2h, 4h, 6h e 8h foram retiradas alíquotas de 1mL dos tubos e a densidade ótica (DO) foi estimada em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda 270nm. Os dados foram visualizados em gráficos plotados no Origin (OriginLab®).

4.4. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

4.4.1. Cultivo Celular

Células VERO (ATCC CCL81), provenientes de rim de macaco verde africano, foram cultivadas em meio MEM - Minimum Essential Media (Gibco) suplementado com 5% de SFB (Gibco), piruvato, L-Glutamina 2mM (Gibco) e penicilina/estreptomicina/anfotericina B 100U/mL (Gibco) para fins de utilização no ensaio de viabilidade celular.

4.4.2. Ensaio de viabilidade celular por MTT

O método de redução do MTT (2H-Tetrazolium, 2-(4,5-dimetil-2-thiazolil)-3,5-difenilbromide) foi utilizado para avaliação da citotoxicidade (MOSMANN, 1983). As células VERO (ATCC CCL81), foram plaqueadas em placas de 96 poços (5×10^4 células/poço) e incubadas por 24 h após o plaqueamento. Após a primeira incubação, o meio de cultura MEM foi aspirado e repostado em um volume de 100µL juntamente com os estímulos: discos dos filmes com 3mm de diâmetro que foram cortados com *punches* dermatológicos.

Foi utilizado como branco, poços apenas com o meio de cultura, como controle negativo as células sem estímulo em meio de cultura e como controle positivo, o meio de cultura com 10% de DMSO. Novamente, a placa foi incubada por 24h na estufa de 5% de CO₂ a 37°C.

Em seguida, o meio de cultura foi aspirado e os poços foram lavados com PBS 1x e adicionou-se 100uL de MTT (5mg/mL) previamente diluído em MEM com fenol a 5% e sem suplementação. Quatro horas depois, retirou-se o conteúdo total da placa e 100µL de DMSO foram adicionados em cada poço homogeneizando vigorosamente para auxiliar na dissolução dos cristais de Formazan. Por fim, a absorbância foi mensurada no comprimento de onda de 570nm em espectrofotômetro.

Para a interpretação dos resultados e cálculos de viabilidade realizou-se a média da absorbância (Abs) das triplicatas de cada uma das amostras avaliadas, controles positivo e negativo e branco, e aplicou-se na fórmula descrita abaixo. O mesmo foi feito para a avaliação em 48h.

$$\text{VIABILIDADE(\%)} = 100 \times \frac{\text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle negativo}}$$

4.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

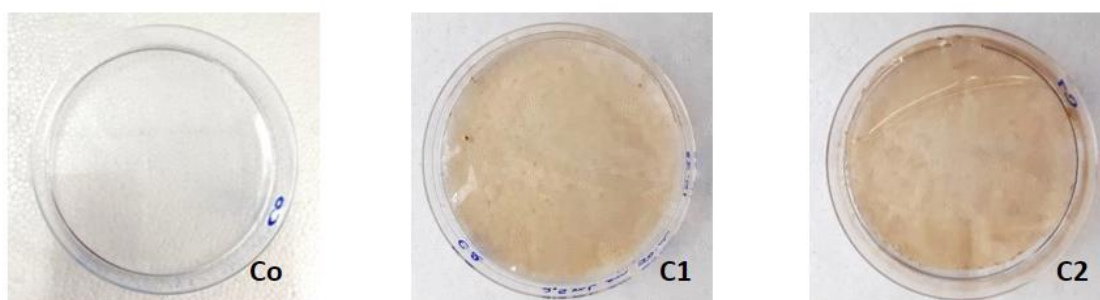
A análise estatística foi realizada usando o software Graphpad Prism versão 8.0.2 para Windows (GraphPad Software ®), utilizando ANOVA para avaliação das medidas de pH de superfície e viabilidade celular. Para ambas, adotou-se nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS FILMES DE AMORA

5.1.1. Aspecto visual do filme de amora

Figura 6 – Aspecto visual dos filmes de amora



Fonte: Autoria própria, 2023

Os filmes C1 e C2 observados junto ao Co na figura 6, apresentaram aspecto homogêneo, flexíveis, apresentaram aparente adesividade em relação a placa de Petri, cor discretamente amarelada e uniforme e não apresentaram bolhas ou rupturas.

5.1.2. Resistência dobrável

Os filmes Co, C1 e C2 foram testados quanto a sua resistência dobrável para determinar a resistência mecânica, pois, segundo Salehi e Boddohi (2019) a resistência à dobra e ruptura é diretamente proporcional a resistência mecânica de um material.

Por sua vez, a resistência mecânica é definida como a capacidade que um material tem de suportar esforços sem sofrer deformações plásticas (ANUSAVICE, 2013). Com isso, todos os filmes foram testados em triplicata e dobrados no mesmo local formando um ângulo de 180° de forma a unir as suas pontas opostas e os dobramentos em cada filme foram repetidos 600 vezes. Nenhuma das amostras testadas apresentou ruptura ou quebra após o procedimento, representando boa flexibilidade e resistência mecânica adequada (> 300) (NAIR et al., 2013; SALEHI; BODDOHI, 2019).

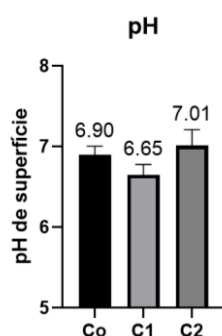
5.1.3. PH de superfície

A avaliação do pH da superfície tem como finalidade determinar se o pH do filme mucoadesivo é compatível com o pH da mucosa bucal para evitar a ocorrência de efeitos tópicos indesejados (NAIR et al., 2013; SALEHI; BODDOHI, 2019).

Apesar da mucosa bucal ser mais suscetível a variações em seu pH, a saliva é um poderoso sistema de tamponamento responsável por manter um pH intraoral estável (AFRAMIAN; DAVIDOWITZ; BENOLIEL, 2006) e por isso é utilizada como referência para compatibilidade nesta região. O nível de concentração de íons de hidrogênio (pH) da saliva de um indivíduo saudável é tradicionalmente medido *ex vivo* e varia entre 6,0 e 7,5 (LOKE et al., 2016). A utilização de filmes com valores de pH mais ácidos ou alcalinos do que o pH salivar podem causar irritação e desconforto na mucosa, além de interferir no grau de hidratação dos polímeros (KUMRIA et al., 2014).

Para os testes, os filmes foram testados em triplicata, e os resultados estão listados no gráfico 1, sendo as médias para Co, o $\text{pH}=6,9\pm0,14$; para C1 $\text{pH}=6,65\pm0,13$ e para C2 $\text{pH}=7,01\pm0,2$; demonstrando que todos possuem pH semelhante e compatíveis os seus usos na cavidade oral.

Gráfico 1. pH de superfície das amostras Co, C1 e C2



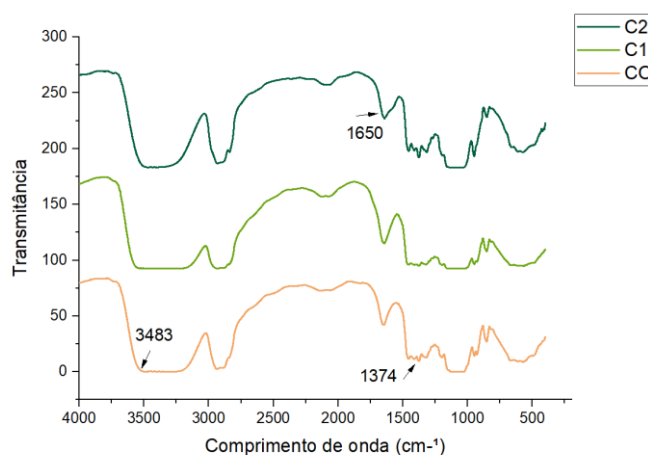
Fonte: Autoria própria, 2023

Estes achados são semelhantes aos obtidos para os filmes de HPMC produzidos por Chen *et al.* (CHEN; BUNTB; WENA, 2014) com o pH de superfície entre 6,1-7,2, assim como os filmes de HPMC produzidos por Sanap *et al.* que apresentaram valores entre 6,65-7,1.

5.1.4. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é utilizado na caracterização e identificação de grupamentos químicos de materiais orgânicos e inorgânicos presentes na estrutura de uma substância. Na figura 7 estão representados os espectros das amostras analisadas e em todas é possível observar vibrações de alongamento características da -OH em $3483,82\text{ cm}^{-1}$ que ocorrem no HPMC, além do pico em 1374 cm^{-1} associado à curvatura simétrica C–O–C do seu grupo metóxi (AHMAD *et al.*, 2022). O alongamento dos grupos metil presentes no HPMC foram identificados em $2901,30\text{ cm}^{-1}$ e os seus grupos propil em 1650 cm^{-1} conforme os resultados obtidos por Punitha *et al.* (2014)

Figura 7 - Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier das amostras C1, C2 e Co



Fonte: Autoria própria, 2023

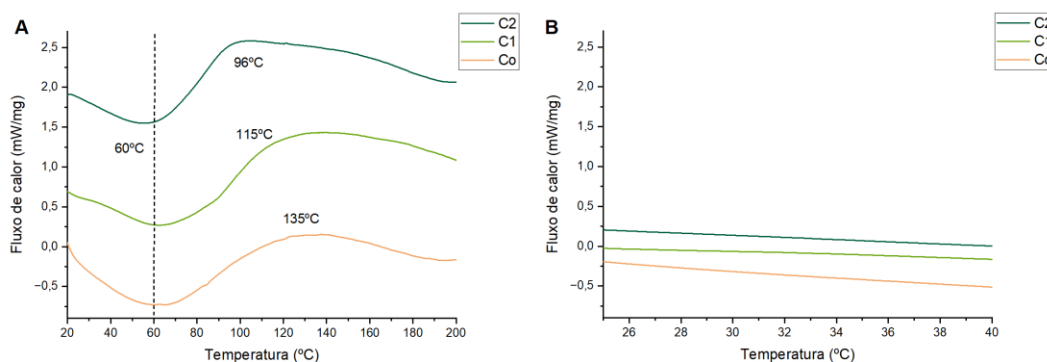
Não houve alteração significativa nos picos característicos do polímero na amostra Co em relação as amostras C1 e C2, o que sugere não haver interação entre os grupos funcionais do polímero e os grupos funcionais do extrato utilizado. Esses achados sugerem que as moléculas do extrato estão intactas no filme mucoadesivo e não há

interação físico-química entre elas e o polímero (MEHER et al., 2013). De fato, é importante que não haja interação a fim de não formar compostos desconhecidos e não afetar a organização e formação do filme.

5.1.5. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

O DSC é utilizado para o monitoramento das variações de entalpia de uma amostra em função da temperatura, possibilitando a avaliação de seu comportamento térmico. O termograma das amostras Co, C1 e C2 estão dados na figura 7A.

Figura 8 - Termograma de C1, C2 e Co entre 20 e 200°C (A) e entre 25 e 40°C (B).



Fonte: Autoria própria, 2023

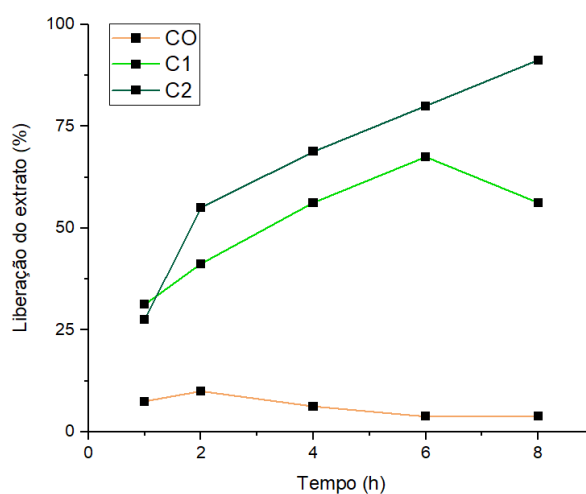
Os resultados mostram um primeiro pico exotérmico em comum para as amostras entre 55°C e 80°C, centralizado em 60°C na figura, junto a um amplo pico endotérmico entre 50 e 135°C já caracterizado para o polímero HPMC (TIMUR et al., 2019). Na figura 7B é observada a ausência de grandes variações de entalpia entre 25°C e 40°C. Desta forma, observa-se um comportamento térmico favorável em relação a temperatura ambiente (25°C) e a temperatura corporal (37°C).

5.2. ENSAIO DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O ensaio de liberação *in vitro* tem como objetivo demonstrar a liberação do conteúdo do filme, o extrato de *Morus nigra*, em função do tempo no meio analisado. Segundo Colombo *et al.* (1996), a liberação em sistemas como este é controlada pela capacidade de difusão do filme no meio e por sua erosão, considerando esses fatores fundamentais para o sucesso da liberação controlada.

As medições foram baseadas nas medidas de densidade ótica das soluções a partir de uma curva-padrão (245 a 290nm) feita com o extrato da *M. nigra* (20% p/v) em diferentes concentrações. Este ensaio utilizou, portanto, a lei de Lambert-Beer, na qual a densidade ótica/absorbância de uma solução de uma substância absorvente obtida por técnicas de espectrometria é diretamente proporcional à concentração da substância (DELGADO, 2022). Desta forma, os resultados obtidos para a liberação in vitro estão descritos na figura abaixo (figura 8).

Figura 9 – Liberação do extrato de amora



Fonte: Autoria própria, 2023

Para o filme C1, observou-se que os valores percentuais de liberação obtidos na solução analisada foram crescentes de 1h até o tempo de 6h, apresentando um declínio em relação a medição realizada em 8h, sugerindo o fim da sua capacidade de liberação após 6h. Para o filme C2, observa-se crescimento no percentual de liberação entre 1h e 6h, seguido por um pico em 8h, sugerindo uma liberação de maior quantidade de componentes do extrato neste intervalo de tempo que pode ser relacionada à maior concentração de extrato em C2 em relação a concentração em C1. A porcentagem de liberação progressiva de C2 (91%) ao longo de 8h, promove uma liberação controlada ao longo do tempo, favorecendo o aumento do intervalo entre as dosagens a serem administradas.

Segundo Hadinugroho *et al.* (2023), o HPMC promove uma liberação mais lenta em relação às formulações convencionais de comprimidos porque sua capacidade de intumescimento aprisiona as moléculas encapsuladas no filme e a libera de forma sustentada. Por sua vez, o glicerol, plastificante utilizado na produção do filme, aumenta

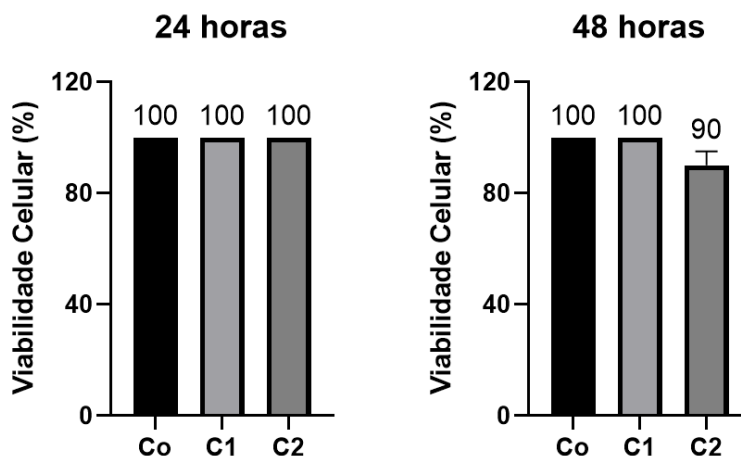
a infiltração do fármaco na pele e membranas mucosas, favorecendo uma boa biodisponibilidade (SINGLA; LEE, 2003).

5.3. ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

5.3.1. Análise de viabilidade celular por MTT em células Vero

O ensaio de MTT foi utilizado para a análise de citotoxicidade através da viabilidade celular, pois em células vivas, o corante amarelo solúvel em água MTT é reduzido a um precipitado de formazan de cor púrpura escura, que pode ser analisado através de espectrofotometria após a dissolução em um solvente orgânico (MOSMANN, 1983). A linhagem celular VERO (ATCC CCL81) é recomendada pela ISO 10993-5 (ISO, 2009) para ensaios de citotoxicidade, como o MTT, por ser uma linhagem bem estabelecida e caracterizada pela literatura. Os resultados obtidos através do ensaio estão representados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Viabilidade celular por MTT em células Vero



Fonte: Autoria própria, 2023

Foi observado que não houve diminuição na viabilidade celular em 24h para as células testadas, sendo a viabilidade de 100% para todos os estímulos testados: Co, C1 e C2. Para 48h, não houve redução da viabilidade para os filmes Co e C1 e, apenas o filme C2, apresentou uma redução para 90%. Por isso, nenhum dos filmes foi considerado citotóxico (<70%) (MOSMANN, 1983). Este resultado é semelhante aos achados de Thamrongwatwongsa *et al.* que demonstraram não haver redução significativa da

viabilidade celular em células Vero e HaCaT para os extratos de folhas e raízes de *M. nigra*.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que este trabalho produziu com sucesso filmes mucoadesivos bucais contendo extrato hidroalcoólico das folhas de *M. nigra* 20% (p/v) visando o tratamento de sintomas climatéricos. Os filmes foram caracterizados físico-quimicamente através de FTIR, DSC, pH de superfície e resistência dobrável, apresentando as características necessárias e adequadas ao seu uso na mucosa bucal. Além disso, foi constatada a capacidade de liberação do extrato através da difusão e erosão do filme em até 8h. E por fim, através do ensaio MTT foi possível concluir que os filmes não apresentam risco de toxicidade celular. Sendo assim, ambos os filmes apresentaram resultados favoráveis ao uso pretendido, com destaque para C2 e sua curva de liberação controlada do extrato em 8 horas que faz com que este desponte como melhor formulação do filme a ser utilizada em futuros ensaios *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- ABDELLA, S. et al. Mucoadhesive Buccal Film of Estradiol for Hormonal Replacement Therapy: Development and In-Vivo Performance Prediction. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2022.
- AFONSO, R. F. et al. Yoga decreases insomnia in postmenopausal women: a randomized clinical trial. **Menopause** v. 19, n. 2, p. 186–193, fev. 2012.
- AFRAMIAN, D. J.; DAVIDOWITZ, T.; BENOLIEL, R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. **Oral Diseases**, v. 12, n. 4, p. 420–423, 1 jul. 2006.
- ALEXANDRE DE ALMEIDA BARRA et al. Terapias alternativas no climatério. **Femina**, v. 42, n. 1, 2014.
- ANUSAVICE, K. J. **Phillips Materiais Dentários**. 2003. v. 13
- ARANTES, D. A. C. et al. Safety and efficacy of a mucoadhesive phytomedication containing curcuminoids and *Bidens pilosa* L. extract in the prevention and treatment of radiochemotherapy-induced oral mucositis: Triple-blind, randomized, placebo-controlled, clinical trial. **Head & neck**, v. 43, n. 12, p. 3922–3934, 1 dez. 2021.
- ASSUNÇÃO, D. et al. Quality of life of climacteric stage women. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 15, n. 2, p. 80–83, 2017.
- AYOUB, N. et al. HPLC/MS n Profiling and Healing Activity of a Muco-Adhesive Formula of *Salvadora persica* against Acetic Acid-Induced Oral Ulcer in Rats. **Nutrients**, v. 14, n. 1, 1 jan. 2021.
- BALA, R. et al. Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 3, n. 2, p. 67, 2013.
- BARAKAT, R. et al. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. **BMB reports**, v. 49, n. 9, p. 488–496, 2016.
- BOATENG, J. S. et al. Development and mechanical characterization of solvent-cast polymeric films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 35, n. 8, p. 986–996, 2009.
- BORUD, E. K. et al. The Acupuncture on Hot Flashes Among Menopausal Women study: observational follow-up results at 6 and 12 months. **Menopause**. v. 17, n. 2, p. 262–268, mar. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Atenção à Mulher no Climatério/Menopausa**. Série Direitos Sexuais e Direitos Reprodutivos, , 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Monografia da espécie Morus nigra L. (AMOREIRA)**. BRASIL, 2015.
- CECCARELLI, I. et al. Estrogens and phytoestrogens in body functions. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 132, p. 648–663, 1 jan. 2022.
- CHANA-JACZMAREK, J. et al. Development and Evaluation of Thermosensitive Hydrogels with Binary Mixture of Scutellariae baicalensis radix Extract and Chitosan for Periodontal Diseases Treatment. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 21, 1 nov. 2021.
- CHEN, G.; BUNTB, C.; WENA, J. Mucoadhesive polymers-based film as carrier system for sublingual delivery of glutathione. 2014.
- CHEN, H. et al. Antinociceptive and Antibacterial Properties of Anthocyanins and Flavonols from Fruits of Black and Non-Black Mulberries. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 23, n. 1, 2018.

CHEN, M. N.; LIN, C. C.; LIU, C. F. Efficacy of phytoestrogens for menopausal symptoms: a meta-analysis and systematic review. **Climacteric**, v. 18, n. 2, p. 260, 1 abr. 2015.

CHO, S. H.; WHANG, W. W. Acupuncture for vasomotor menopausal symptoms: a systematic review. **Menopause**, v. 16, n. 5, p. 1065–1073, set. 2009.

COBOS, M. et al. Study on the effect of graphene and glycerol plasticizer on the properties of chitosan-graphene nanocomposites via in situ green chemical reduction of graphene oxide. **International journal of biological macromolecules**, v. 114, p. 599–613, 15 jul. 2018.

COLOMBO, P. et al. Analysis of the swelling and release mechanisms from drug delivery systems with emphasis on drug solubility and water transport. **Journal of Controlled Release**, v. 39, n. 2–3, p. 231–237, 1 maio 1996.

COSTA, J. P. L. et al. Randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of *Morus nigra* L. (black mulberry) leaf powder on symptoms and quality of life among climacteric women. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, v. 148, n. 2, p. 243–252, 1 fev. 2020.

DANIELLA DA SILVA, M. et al. Uso dos fitoterápicos isoflavona e folhas de amora como tratamento no climatério: revisão sistemática. **Concilium**, v. 22, n. 6, p. 107–116, 1 nov. 2022.

DELGADO, R. Misuse of Beer–Lambert Law and other calibration curves. **Royal Society Open Science**, v. 9, n. 2, 2022.

DI PRIMA, G.; CONIGLIARO, A.; DE CARO, V. Mucoadhesive Polymeric Films to Enhance Barbaloin Penetration Into Buccal Mucosa: a Novel Approach to Chemoprevention. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 1, 1 jan. 2019.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1380–1384, 1 jan. 2007.

FONSECA-SANTOS, B.; CHORILLI, M. An overview of polymeric dosage forms in buccal drug delivery: State of art, design of formulations and their in vivo performance evaluation. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 86, p. 129–143, 1 maio 2018.

GALEY, W. R.; LONSDALE, H. K.; NACHT, S. The in vitro permeability of skin and buccal mucosa to selected drugs and tritiated water. **The Journal of investigative dermatology**, v. 67, n. 6, p. 713–717, 1976.

GASS, M. L. S. et al. The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. **Menopause**, v. 19, n. 3, p. 257, mar. 2012.

GILHOTRA, R. M. et al. A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. **Journal of Biomedical Research**, v. 28, n. 2, p. 81, 2014.

GUARVE, K.; KRIPLANI, P. HPMC- A Marvel Polymer for Pharmaceutical Industry-Patent Review. **Recent advances in drug delivery and formulation**, v. 15, n. 1, p. 46–58, 2021.

HADINUGROHO, W. et al. Hydroxypropyl Methylcellulose as Hydrogel Matrix and Citric Acid-Locust Bean Gum as Negative Matrix for Controlled Release Tablet. **ACS Omega**, v. 8, n. 8, p. 7767–7778, 28 fev. 2023.

HAO, J. et al. Phytochemicals, Pharmacological Effects and Molecular Mechanisms of Mulberry. **Foods**, v. 11, n. 8, 1 abr. 2022.

HEMSELL, D. L. et al. Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 38, n. 3, p. 476–479, 1974.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-5 - Biological evaluation of medical devices. Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**. 2009.

KARKI, S. et al. Thin films as an emerging platform for drug delivery. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 5, p. 559–574, 1 out. 2016.

KUIPER, G. G. J. M. et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252–4263, 1998.

KUMRIA, R. et al. Buccal films of prednisolone with enhanced bioavailability. **Drug Deliv** v. 23, n. 2, p. 471–478, 12 fev. 2014.

LOBO, R. A.; GOMPEL, A. Management of menopause: a view towards prevention. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, 5 maio 2022.

LOKE, C. et al. Factors affecting intra-oral pH - a review. **Journal of oral rehabilitation**, v. 43, n. 10, p. 778–785, 1 out. 2016.

ŁOPIEŃ, R. S. et al. Disturbances of sleep continuity in women during the menopausal transition. **Psychiatr. Pol**, v. 49, n. 3, p. 615–623, 2015.

MA, Y. et al. Electroacupuncture reactivates estrogen receptors to restore the neuroprotective effect of estrogen against cerebral ischemic stroke in long-term ovariectomized rats. **Brain and behavior**, v. 11, n. 10, 1 out. 2021.

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, 1 jul. 2013.

MIKHAEL, S.; PUNJALA-PATEL, A.; GAVRILOVA-JORDAN, L. Hypothalamic-pituitary-ovarian axis disorders impacting female fertility. **Biomedicines**. MDPI AG, , 1 mar. 2019.

MINKIN, M. J. **Menopause: Hormones, Lifestyle, and Optimizing Aging. Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**. W.B. Saunders, 1 set. 2019.

MIRANDA, M. A. et al. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU rev**, 2010.

MIRANDA, S. DA S. et al. O chá da folha de *Morus nigra* como agente promotor de qualidade de vida em mulheres na transição menopáusica. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 9, p. e4288–e4288, 25 set. 2020.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.

NAIR, A. B. et al. In vitro techniques to evaluate buccal films. **Journal of Controlled Release**, v. 166, n. 1, p. 10–21, 28 fev. 2013.

O'CONNELL, M. B. Pharmacokinetic and Pharmacologic Variation Between Different Estrogen Products. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 9 S, p. 18S–24S, 1995.

PACZKOWSKA-WALENDOWSKA, M. et al. Cyclodextrin as functional carrier in development of mucoadhesive tablets containing polygoni cuspidati extract with potential for dental applications. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 11, 1 nov. 2021.

PADILHA, M. M. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 621–626, set. 2010.

PEACOCK, K.; KETVERTIS, K. M. Menopause. **StatPearls**, 2 fev. 2022.

PEREIRA, J. P. C. Efeitos estrogênicos da suplementação com extratos de linhaça (*Linum usatissimum*) e/ou amoreira (*Morus nigra*) em ratas ovariectomizadas. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2019.

PERIOLI, L. et al. Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 99, n. 1, p. 73–82, set. 2004.

PETERS, K. J. What Is Genitourinary Syndrome of Menopause and Why Should We Care? **The Permanente journal**, v. 25, 1 maio 2021.

PROSSNITZ, E. R.; BARTON, M. Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. **Molecular and Cellular Endocrinology**. Elsevier Ireland Ltd, , 25 maio 2014.

PUNITHA, S. et al. Physico-chemical studies on some saccharides in aqueous cellulose solutions at different temperatures – Acoustical and FTIR analysis. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 657–665, 1 nov. 2014.

RIDWAN, R. D. et al. A study of the mucoadhesive patches loaded with mangosteen peel extract in periodontitis. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 16, n. 6, p. 864–869, 1 dez. 2021.

RUGGIERO, R. J.; LIKIS, F. E. Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. **Journal of Midwifery and Women's Health**, v. 47, n. 3, p. 130–138, 2002.

SALEHI, S.; BODDOHI, S. New formulation and approach for mucoadhesive buccal film of rizatriptan benzoate. **Progress in Biomaterials**, v. 6, n. 4, p. 175, 1 dez. 2017.

SALEHI, S.; BODDOHI, S. Design and optimization of kollicoat® IR based mucoadhesive buccal film for co-delivery of rizatriptan benzoate and propranolol hydrochloride. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 230–244, 1 abr. 2019.

SANAP, S. N. et al. Chitosan/HPMC-based mucoadhesive film co-loaded with fluconazole and ofloxacin for management of polymicrobial keratitis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 222, p. 2785–2795, 2022.

SAYED, A. A.; ELFIKY, A. A. In silico estrogen-like activity and in vivo osteoclastogenesis inhibitory effect of *Cicer arietinum* extract. **Cellular and Molecular Biology**. 30 de abril de 2018;64(5):29-39

SCHMIDT, T. R. et al. Mucoadhesive formulation containing *Curcuma longa* L. reduces oral mucositis induced by 5-fluorouracil in hamsters. **Phytotherapy research: PTR**, v. 33, n. 4, p. 881–890, 1 abr. 2019.

SHARIFI, N.; AFSHARI, F.; BAHRI, N. The effects of yoga on quality of life among postmenopausal women: A systematic review study. **Post reproductive health**, v. 27, n. 4, p. 215–221, 1 dez. 2021.

SHIFREN, J. L. et al. **The North American Menopause Society recommendations for clinical care of midlife women. Menopause**. Lippincott Williams and Wilkins, , 2014.

SHINDE, S.; GHONGE, M.; KATHPALIA, H. Recent Updates on Oral and Dermal Film-based Formulations and their Applications. **Current drug delivery**, v. 19, 8 mar. 2022.

SILVA, E. C.; SOUZA, T. DE M.; CERQUEIRA, M. V. V. Efeitos da *Morus nigra* L. na síndrome climatérica: uma revisão de literatura. Brasília: Universidade Católica de Brasília, 2021.

SINGLA, R.; LEE, C. H. Effects of glycerol on the in vitro percutaneous absorption of all-trans retinoic acid. **Pharmaceutical development and technology**, v. 8, n. 3, p. 229–237, 2003.

SOLAKOGLU, O. et al. The Effect of Yoga Asana “Vrksasana (Tree Pose)” on Balance in Patients with Postmenopausal Osteoporosis: A Randomized Controlled Trial. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, v. 101, n. 3, p. 255–261, 1 mar. 2022.

SOUROUNI, M. et al. Assessment of the climacteric syndrome: a narrative review. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 304, n. 4, p. 855–862, 1 out. 2021.

STACHOWIAK, N.; KOWALONEK, J.; KOZŁOWSKA, J. Effect of plasticizer and surfactant on the properties of poly(vinyl alcohol)/chitosan films. **International journal of biological macromolecules**, v. 164, p. 2100–2107, 1 dez. 2020.

SUSANTI, H. D. et al. Effects of yoga on menopausal symptoms and sleep quality across menopause statuses: A randomized controlled trial. **Nursing & health sciences**, 2022.

TAEBI, M. et al. Strategies to improve menopausal quality of life: A systematic review. **Journal of Education and Health Promotion**, v. 7, n. 1, p. 93, 2018.

TANGSUKSAN, P. et al. Mucoadhesive film containing α -mangostin shows potential role in oral cancer treatment. **BMC oral health**, v. 21, n. 1, 1 dez. 2021.

TEMPFER, C. B. et al. Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. **Fertility and sterility**, v. 87, n. 6, p. 1243–1249, jun. 2007.

THAMRONGWATWONGSA, J. et al. Mulberroside F from In Vitro Culture of Mulberry and the Potential Use of the Root Extracts in Cosmeceutical Applications. **Plants** (Basel, Switzerland), v. 12, n. 1, 1 jan. 2022.

TIMUR, S. S. et al. Localized drug delivery with mono and bilayered mucoadhesive films and wafers for oral mucosal infections. **International journal of pharmaceutics**, v. 559, p. 102–112, 25 mar. 2019.

TURNER, J. V.; AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; GLASS, B. D. Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 8, p. 1879–1885, 2007.

WANG, X. et al. Exploring the biological activity and mechanism of xenoestrogens and phytoestrogens in cancers: Emerging methods and concepts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 2 ago. 2021.

WANG-CHENG, R.; ROSENFELD, JO A. Hormone Replacement Therapy. **BMJ**, v. 327, n. 7418, p. E139, 17 fev. 2022.

WARD, K.; DENERIS, A. An Update on Menopause Management. **Journal of Midwifery and Women's Health** John Wiley and Sons Inc. 1 mar. 2018.

XIE, Y. M. et al. Clinical practice guideline for postmenopausal osteoporosis with traditional Chinese medicine. **China journal of Chinese materia medica**, v. 46, n. 22, p. 5992–5998, 15 nov. 2021.

YOSHIKATA, R. et al. Effects of an equol-containing supplement on advanced glycation end products, visceral fat and climacteric symptoms in postmenopausal women: A randomized controlled trial. **PLoS ONE**, v. 16, n. 9, 1 set. 2021.

ZHONG, Z. et al. Electroacupuncture for the treatment of perimenopausal syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Acupuncture in medicine: journal of the British Medical Acupuncture Society**, v. 40, n. 2, p. 111–122, 1 abr. 2022