UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA
DOUTORADO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

EFEITO REPARADOR TECIDUAL DE UMA POMADA ORABASE DE EXTRATO DE *Libidibia ferrea* L. PARA O TRATAMENTO DE ÚLCERAS DA CAVIDADE BUCAL EM RATOS DIABÉTICOS.

Doutoranda: LUCIANA ALEIXO DOS SANTOS DE MELO

MANAUS – AM
2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA DA ASSOSSIAÇÃO EM REDE DE IES
DOUTORADO EM INOVAÇÃO FARMACÊUTICA

LUCIANA ALEIXO DOS SANTOS DE MELO

EFEITO REPARADOR TECIDUAL DE UMA POMADA ORABASE DE EXTRATO DE *Libidibia ferrea* L. PARA O TRATAMENTO DE ÚLCERAS DA CAVIDADE BUCAL EM RATOS DIABÉTICOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Farmacêutica da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para obtenção do título de Doutora em Inovação Farmacêutica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Co-orientadora: Profa. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde

MANAUS – AM
2024

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M528e

Melo, Luciana Aleixo dos Santos de
Efeito reparador tecidual de uma pomada orabase de extrato de Libidibia ferrea L. para o tratamento de úlceras da cavidade bucal em ratos diabéticos. / Luciana Aleixo dos Santos de Melo . 2024
132 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Fulgência Costa Lima Bandeira
Coorientadora: Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Tese (Doutorado em Inovação Farmacêutica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Cicatrização. 2. Fitoterapia. 3. Úlceras orais. 4. Libidibia ferrea. 5. Diabetes Mellitus. I. Bandeira, Maria Fulgência Costa Lima. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

DEDICATÓRIA

À minha filha Cecília Aleixo, força e luz da minha vida,
espero ser sua luz e sua inspiração para todo sempre. É e será tudo por você.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por me permitir viver até hoje este momento de engrandecimento profissional, foi um ano muito difícil e me sinto grata por toda benção recebida, sem sua proteção e graça não teria forças para continuar meus projetos, a força que percebi que tenho este ano devo graças ao Senhor, meu Deus.

À minha família, em especial aos meus pais Sandra Aleixo e Wesley Fazzioni, a madrinha-mãe Therezinha Aleixo e minha tia-mãe Leonor Bernadete, sem o carinho, amor e apoio incondicional de todos, este momento seria inalcançável. Agradeço imensamente por vocês acreditarem no meu potencial, e, muitas vezes colocarem de lado suas prioridades para sonharem o meu sonho e construírem junto comigo cada um deles.

A minha orientadora profa. Dra. Maria Fulgência por primeiramente acreditar no meu potencial e principalmente que eu seria capaz de concluir este projeto ao seu lado. Agradeço a confiança e apoio em meu trabalho e por sempre aprender ao seu lado. Uma grande mãezinha cientifica que se tornou uma grande inspiração para mim. Obrigada por toda paciência neste caminho e por sua compreensão no momento para mim mais difícil.

A minha co-orientadora profa. Dra. Nikeila Conde, minha segunda mãezinha científica, por ser um ser humano de um coração de luz e de incrível competência. Obrigada por todo apoio incondicional, palavras de carinho e incentivo e por acreditar sempre na capacidade do meu trabalho, confiando a mim a honra de poder aprender mais uma vez ao seu lado. Minha grande inspiração profissional e pessoal.

Ao Cristiano Carioca, meu grande amigo e hoje o homem que ocupa o lugar no meu coração, você me ensina todos os dias a nunca duvidar do meu potencial, obrigada por acreditar nos meus sonhos e sonhar junto comigo, obrigada pela paciência da espera para hoje vivermos o que tanto queríamos um para o outro, o nosso relacionamento. A sua admiração por mim, inspira-me a ser cada dia melhor para você e minha filha, você tem se tornado minha inspiração pelo grande homem, companheiro e parceiro, conte sempre comigo e vamos seguir sempre juntos.

A minha amiga e parceira de estudos Priscila Machado que possamos compartilhar juntas muitas alegrias e vitórias, obrigada por todos estes anos compartilhados, por todo apoio, por cada palavra e presença nos momentos mais difíceis e que não foram poucos. Nosso presente pode ser de muitas batalhas, mas nosso futuro de vitória é certo.

Aos meus amigos, Diana Melo, Maria Fernanda, Fernando Gonçalves Anselmo Matos e Larissa Ketlen por toda amizade construída nesses anos, vocês são peças fundamentais em meu crescimento pessoal e profissional, que possamos sempre compartilhar muitos anos de muito amor, alegria e prosperidade. Vocês sempre serão fundamentais em minha vida.

À equipe de professores e trabalhadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-UFAM), por todo auxílio, acolhimento e incentivo durante todo Doutorado, e principalmente aos professores por fazerem acontecer esta etapa mesmo com as dificuldades vividas em nossa recente história de pandemia, em especial as professoras Dra. Tatiane Pereira, Dra. Marne Vasconcellos e ao professor e nosso coordenador Dr. Emerson Lima. Agradeço ainda a Maria Clara por toda atenção prestada durante este percurso.

À equipe de professores e trabalhadores da Universidade do Ceará (UFC), em especial à Profa. Dra. Ana Paula e futura doutora Imaculada Queiroz, por toda ajuda no experimento e conhecimento/aprendizado, sem o apoio da equipe parte deste trabalho não se tornaria possível, agradeço a parceria e que no futuro se firme com muito mais parcerias e publicações aos grupos.

A todos os meus alunos, por todo incentivo em meu Doutorado, não existe mestre que não possa ser aluno pois a vida é uma grande universidade. Portanto, pouco ensina a quem não sabe ser um aluno que eu continue sendo inspiração em seus caminhos.

A todos os colegas do IAES pela compreensão durante esta caminhada, gratidão pelo apoio nos momentos em que mais foi preciso a minha ausência para me dedicar a minha evolução profissional para a docência e pesquisa.

Agradeço ainda ao grupo do laboratório de estatística – LabEst, que colaborou com seus conhecimentos e contribuíram aos grandes resultados encontrados nesta pesquisa, em especial ao Lucas Pereira, ao Dr. José Clelto e ao Me. Erico Jander que em todos os momentos foram muito solícitos.

À FAPEAM pelo apoio e incentivo financeiro neste projeto.

Agradeço, por fim, a todos que direto ou indiretamente ajudaram na minha caminhada.

RESUMO

A *Libidibia ferrea* L. (jucá) tem demonstrado resultados promissores terapêuticos anti-inflamatório e cicatrizante, antimicrobiano, analgésico e antitérmico. O presente estudo realizou o controle de qualidade físico-químico e avaliou a atividade cicatrizante em úlceras orais induzidas sob a terapia tópica com pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. em ratos portadores de *diabetes mellitus*. Para tal, realizou-se o Estudo 1 - "*in vitro*": testes de centrifugação, pH, densidade, comportamento reológico, avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes e microrganismos patogênicos e características organolépticas, nas condições físicas de armazenamento e os períodos experimentais; e o Estudo 2 - "*in vivo*": ação cicatrizante da pomada em úlceras orais de ratos portadores de *diabetes mellitus*, divididos em 5 grupos: controle negativo – ratos normossistêmicos (G1), controle positivo – ratos diabéticos (G2), controle positivo - triancinolona (G3), grupo jucá (G4) e grupo orabase (G5), através da análise histopatológica, colagênese, imuno-histoquímica para IL-1, TNF-α, TGF-β e CD31, nos dias 01, 05 e 10 pós indução ulcerativa. No estudo 1, observou-se discreta separação de fase oleosa sem precipitados nas condições testadas; no teste de pH houve diferença significativa entre as condições testadas sendo que a geladeira apresentou diferença significativa em relação ao Ar condicionado e TAC, apresentando o pH mais estável (±6,56); a densidade apresentou estabilidade durante os 12 meses; na viscosidade a pomada foi do tipo pseudoplástico/plástico; a avaliação microbiológica não demonstrou presença de contaminantes; não houve alterações de cor, com odor forte e aromático e presença de brilho e consistência lisa, ausência de granulações. O estudo 2 demonstrou diferenças nos valores dos tamanhos ulcerativos bem como sua redução durante o período avaliado. Os grupos G1 e G4 foram os que apresentaram os menores tamanhos ulcerativos no final do experimento, 5,26 cm e 6,42 cm, respectivamente. Avaliando o peso corporal dos ratos observou-se que o G1 (7,84) apresentou ganho de peso em todos os períodos e o G4 nos dias 05 (2,75) e 10 (4,45), bem como o grupo G5 (6,60) no dia 10. Histopalogicamente, não houve diferença significativa nos escores ulcerativos nos dias 01 e 05 em todos os grupos (score 4). Entretanto, no dia 10 houve diferença significativa entre os grupos G1 (2,75) e G5 (3,62), não existindo esta diferença nos demais grupos. Pôde-se observar entre os grupos G1 e G4 os melhores resultados para atividade de colágeno total (22,11 e 19,77), tipo I (14,80 e 13,91) e tipo III (7,31 e 5,85) depois dos 10 dias. A análise imunohistoquímica demonstrou um retardo da cicatrização associado a elevados níveis de IL-1, principalmente no grupo G3 (741,20). Ao avaliar o TNF-α, observou a diminuição em todos os grupos, excetuando no G1 (11,33) e G3 (50,20) que não houve mudanças significativas. No dia 05 que todos os grupos tiveram um aumento de TGF-β, com exceção do grupo G5 (9,50), nota-se ainda um aumento significativo nos grupos G2 (181,67), G3 (119,20) e G4 (24,33) no dia 10. Por fim, ao avaliar o CD31, nenhum dos grupos apresentaram diferenças estatísticas no dia 05, contudo no dia 10 os que mais expressaram foram os grupos G4 (130,33) e G5 (150,00). Com bases nos resultados apresentados, a formulação apresentou estabilidade físico-química em todas as condições de armazenamento e tempo testados, com melhores resultados no armazenamento em geladeira, bem como uma efetividade no reparo tecidual, sugerindo a indicação da atividade cicatricial da formulação fitoterápica proposta quando utilizada para tratamento de úlceras orais em ratos diabéticos.

Palavras-chave: Cicatrização; Fitoterapia; Úlceras orais; *Libidibia ferrea*; Diabetes Mellitus.

ABSTRACT

Libidibia ferrea L. (jucá) has demonstrated promising therapeutic results in anti-inflammatory and healing, antimicrobial, analgesic and antipyretic properties. The present study performed physicochemical quality control and evaluated the healing activity in oral ulcers induced under topical therapy with Libidibia ferrea L. orabase ointment in rats with diabetes mellitus. For this purpose, Study 1 was carried out - "*in vitro*": centrifugation tests, pH, density, rheological behavior, microbiological evaluation for research of contaminants and pathogenic microorganisms and organoleptic characteristics, under the physical storage conditions and experimental periods; and Study 2 - "*in vivo*": healing action of the ointment on oral ulcers of rats with diabetes mellitus, divided into 5 groups: negative control - normosystem rats (G1), positive control - diabetic rats (G2), positive control - triamcinolone (G3), jucá group (G4) and orabase group (G5), through histopathological analysis, collagenesis, immunohistochemistry for IL-1, TNF-α, TGF-β and CD31, on days 01, 05 and 10 after ulcerative induction. In study 1, discrete separation of the oily phase without precipitates was observed under the conditions tested; in the pH test, there was a significant difference between the conditions tested, with the refrigerator showing a significant difference in relation to the air conditioning and TAC, presenting the most stable pH (±6.56); the density was stable during the 12 months; in terms of viscosity, the ointment was of the pseudoplastic/plastic type; the microbiological evaluation did not demonstrate the presence of contaminants; there were no color changes, with a strong and aromatic odor and the presence of shine and smooth consistency, and absence of granulations. Study 2 demonstrated differences in the values of ulcer sizes as well as their reduction during the evaluated period. Groups G1 and G4 were those that presented the smallest ulcer sizes at the end of the experiment, 5.26 cm and 6.42 cm, respectively. Evaluating the body weight of the rats, it was observed that G1 (7.84) presented weight gain in all periods and G4 on days 05 (2.75) and 10 (4.45), as well as group G5 (6.60) on day 10. Histopathologically, there was no significant difference in ulcer scores on days 01 and 05 in all groups (score 4). However, on day 10 there was a significant difference between groups G1 (2.75) and G5 (3.62), with no such difference existing in the other groups. The best results for total collagen activity (22.11 and 19.77), type I (14.80 and 13.91) and type III (7.31 and 5.85) were observed between groups G1 and G4 after 10 days. Histopathologically, there was no significant difference in ulcerative scores on days 01 and 05 in all groups (score 4). However, on day 10 there was a significant difference between groups G1 (2.75) and G5 (3.62), with no such difference in the other groups. The best results for total collagen activity (22.11 and 19.77), type I (14.80 and 13.91) and type III (7.31 and 5.85) were observed between groups G1 and G4 after 10 days. Immunohistochemical analysis demonstrated delayed healing associated with high levels of IL-1, mainly in group G3 (741.20). When evaluating TNF-α, a decrease was observed in all groups, except in G1 (11.33) and G3 (50.20) where there were no significant changes. On day 05, all groups had an increase in TGF-β, with the exception of group G5 (9.50), and a significant increase was also noted in groups G2 (181.67), G3 (119.20) and G4 (24.33) on day 10. Finally, when evaluating CD31, none of the groups showed statistical differences on day 05, however, on day 10, those that expressed the most were groups G4 (130.33) and G5 (150.00). Based on the results presented, the formulation showed physical-chemical stability in all storage conditions and time tested, with better results when stored in the refrigerator, as well as effectiveness in tissue repair, suggesting the indication of the healing activity of the proposed phytotherapeutic formulation when used for the treatment of oral ulcers in diabetic rats.

Key-words: Healing; Phytotherapy; Oral ulcers; *Libidibia ferrea;* Diabetes Mellitus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação ulcerativa 24
Figura 2 – Fluxograma dos estudos "*in vivo*" e "*in vitro*" 52
Figura 3 - Árvore de *Libidibia ferrea* L. 53
Figura 4 – Casca do caule de *Libidibia ferrea* L. secas 53
Figura 5 – Estufa de ar circulante 54
Figura 6 – Moinho de facas 54
Figura 7 – Matéria-prima vegetal 54
Figura 8 – Pesagem do extrato bruto 54
Figura 9 – Água/etanol 54
Figura 10 – Decoctor 54
Figura 11a e 11b – Filtragem 55
Figura 12 – Aparelho Spray dryer 55
Figura 13 – Extrato seco 55
Figura 14 – Armazenamento do rendimento do extrato seco a 7,5% 55
Figura 15a e 15b – Componentes da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. 56
Figura 16a, 16b e 16c – Aquecimento em banho-maria, pomada orabase de *L. ferrea* L. a 7,5 e pomada orabase 56
Figura 17 – Centrifugação das pomadas 58
Figura 18 – Aferição do pH da pomada 58
Figura 19a, 19b e 19c – Picnômetro vazio, picnômetro com água e picnômetro cheio 59
Figura 20 – Viscosímetro Brookfield DV-II + pro 60
Figura 21 – Distribuição dos ratos de acordo com os grupos experimentais 61
Figura 22 – Anestesia intraperitoneal 62
Figura 23 – Indução ulcerativa (8 cm) 63
Figura 24 – Úlcera induzida – lado esquerdo 63
Figura 25 – Mensuração ulcerativa com paquímetro digital 63
Figura 26 – Pesagem dos animais 64
Figura 27a, 27b e 27c – Aplicação dos agentes testes nos grupos específicos 64
Figura 28 – Remoção do fragmento 65
Figura 29 – Formol 10% 65
Figura 30 – Bloco de parafina 65
Figura 31 – Solidificação do bloco 65

Figura 32 – Micrótomo 65
Figura 33 – Banho-maria 65
Figura 34 – Lâminas histológicas dos grupos experimentais (Coloração HE) 66
Figura 35 – Cromatograma do extrato de *Libidibia ferrea* L. a 7,5% 70
Figura 36 – Pomada orabase (tempo 0) após centrifugação 73
Figura 37 – Pomada orabase TAE (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação 74
Figura 38 – Pomada orabase TAC (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação 74
Figura 39 – Pomada orabase geladeira (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação 74
Figura 40 – Pomada orabase estufa (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação 74
Figura 41 – Pomada orabase ar-condicionado (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação 74
Figura 42 – Variação do pH (em meses) de acordo com as condições de armazenamento 76
Figura 43 - Variação da densidade de acordo com as condições de armazenamento 78
Figura 44 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 0) 79
Figura 45 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 - estufa) 80
Figura 46 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 – ar-condicionado) 80
Figura 47 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 - TAC) 80
Figura 48 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 - geladeira) 81
Figura 49 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 - TAE) 81
Figura 50 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 - estufa) 82
Figura 51 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 – ar-condicionado) 82
Figura 52 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 - TAC) 82
Figura 53 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 - geladeira) 83
Figura 54 – Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 - TAE) 83
Figura 55 – Aspecto visual da pomada orabase de *L. ferrea* L. de consistência lisa e brilhante, ausente de granulações (tempo 0) 84
Figura 56 – Aspecto visual sem alterações nas condições de armazenamento testadas (1, 2, 3, 6 e 12 meses) 84
Figura 57 – Variação diâmetro maior, por período experimental, de acordo com os grupos 86
Figura 58 – Variação área da úlcera, por período experimental, de acordo com os grupos 86
Figura 59 – Representação clínica das úlceras orais dos grupos e tempos testados 88
Figura 60 – Taxa de variação dos pesos, por período experimental, de acordo com os grupos 90
Figura 61 – Resumo dos dados estatísticos – escores ulcerativos 92

Figura 62 – Análise histopatológica dos grupos experimentais, de acordo com os escores histológicos (200x) 94
Figura 63 - Variação do Colágeno Total, por período experimental, de acordo com os grupos 96
Figura 64 – Variação do Colágeno I, por período experimental, de acordo com os grupos 97
Figura 65 – Variação do Colágeno III, por período experimental, de acordo com os grupos ...98
Figura 66 – Análise da atividade de colagênese dos grupos experimentais 99
Figura 67 – Variação do IL-1, por período experimental, de acordo com os grupos 103
Figura 68 – IL-1 – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais (400x) 103
Figura 69 – Variação do TNF-α, por período experimental, de acordo com os grupos 105
Figura 70 – TNF-α – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais (400x) 105
Figura 71 – Variação do TGF-β, por período experimental, de acordo com os grupos 107
Figura 72 – TGF-β – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais 108
Figura 73 - Variação do CD31, por período experimental, de acordo com os grupos.....111
Figura 74 - CD31 – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais 111
Figura 75 – Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFC 132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores de crescimento envolvidos na reparação tecidual 28
Tabela 2 – Análise microscópica de úlceras orais induzidas (escores histológicos) 66
Tabela 3 – Substâncias caracterizadas por LC-MS.MS em extrato de *L. ferrea* L. a 7,5% 70
Tabela 4 – Comparação do pH em relação aos grupos nos diferentes tempos 76
Tabela 5 – Comparação da densidade em relação aos grupos nos diferentes tempos 77
Tabela 6 - Distribuição dos animais nos grupos experimentais 85
Tabela 7 – Maior diâmetro ulcerativo gos grupos experimentais (cm) 86
Tabela 8 – Diferenças ulcerativas nos grupos experimentais 87
Tabela 9 - Taxa de variação dos Pesos entre os grupos experimentais 90
Tabela 10 – Mudança de massa 90
Tabela 11 - Teste de diferença - Escores ulcerativos 92
Tabela 12 – Análise do Colágeno Total nos grupos experimentais 95
Tabela 13 – Análise do Colágeno I nos grupos experimentais 96
Tabela 14 – Análise do Colágeno III nos grupos experimentais 97
Tabela 15 – Análise da IL-1 nos grupos experimentais 102
Tabela 16 – Análise do TNF-α nos grupos experimentais 104
Tabela 17 – Análise do TGF-β nos grupos experimentais 107
Tabela 18 – Análise do CD31 entre os grupos experimentais 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM – *Diabete melittus*

TNF – Fator de necrose tumoral

TGF – Fator de crescimento

PDGF – Fator de crescimento derivados das plaquetas

EGF – Fator de crescimento epidérmico

PAF – Ativador e indutor de plaquetas

IL – Interleucinas

CTAP-III – Peptídeo ativador de tecido conjuntivo III

GRO-a e NAP-2 – Quimiocininas

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

MMPS – Metaloproteinases

ROS – Espécie reativa de oxigênio

LTB4 – Leucotrieno B4

A.C. – Antes de Cristo

OMS- Organização Mundial de Saúde

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS – Sistema Único de Saúde

RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde

AM - Amazonas

MTT – 3- (4,5-dimetiltiazol-2yl-) -2,5-di-fenilbrometo de tetrazolina

EPR- Efeito de permeabilidade e retenção

UFC/ml – Unidades formadoras de colônias por ml (mililitro)

pH- Potencial hidrogeniônico

HPLC/CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

UFAM – Universidade Federal da Amazônia

UFC – Universidade Federal do Ceará

LABFITO – Laboratório de Atividade Biolo1gica em Fitoterápicos em Odontologia

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

MPV – Matéria-prima vegetal

CMC – Carboximetilcelulose

DAD – Detectores arranjo de diodo

APCI – Ionização química a pressão atmosférica

RPM – Rotação por minuto

HCl – Cloreto de hidrogênio

HE – Hematoxilina eosina

RGB – Sistema de cores tricromática

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

PBS – Solução Tampão Fosfato

EPM – Erro padrão da média

TAC – Temperatura ambiente claro

TAE – Temperatura ambiente escuro

MEC – Matriz extracelular

LISTA DE SÍMBOLOS

α - Alfa

β - Beta

% - Porcentagem

°C – Graus Celsius

π - Pi

G – Grama

Mg – Miligrama

Kg – Quilograma

Dl – Decilitro

μm – Micrômetro

Cm – Centímetro

v/v – Volume de soluto

m/v – Massa de soluto

Min – Minuto

g/cm^3 – Grama por centímetro cúbico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....22
2.1. Lesões ulcerativas da cavidade bucal e seu processo de reparação tecidual.....22
2.2. Diabetes melittus e suas manifestações na cavidade bucal.....29
2.3. Plantas medicinais e Fitoterapia.....33
2.3.1. *Libidibia ferrea* L. (*Martius ex* Tul.) 36
2.4 Desenvolvimento Tecnolo1gico farmacêutico.....39
2.5 Controle de qualidade dos produtos fitoterápicos.....45
3. OBJETIVOS.....50
3.1 Objetivo geral.....50
3.2 Objetivos específicos.....50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....51
4.1 Consentimento para pesquisa.....51
4.2 Coleta de material vegetal e preparo do extrato.....51
4.3 Rendimento da pomada orabase.....53
4.4 Preparo da pomada orabase.....54
4.5 Quantificação das substâncias majoritárias do extrato e pomada de *Libidibia ferrea* L. 55
4.6 Caracterização da pomada.....56
4.7 Testes físico-químicos de controle de qualidade.....56
4.7.1 Teste de centrifugação.....56
4.7.2 Teste de pH.....56
4.7.3 Teste de densidade.....57
4.7.4 Teste reológico.....58
4.7.5 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes e microrganismos patogênicos – Controle microbiológico da pomada orabase.....58
4.7.6 Avaliação das características organolépticas.....58
4.8 Teste de atividade cicatricial de colagênese e apoptose de fibroblastos em mucosa jugal de ratos diabéticos.....59
4.8.1 Indução de diabetes.....60
4.8.2 Indução ulcerativa.....60

4.8.3 Avaliação clínica.....61
4.8.4 Avaliação da diferença de peso corpóreo.....61
4.8.5 Aplicação dos fármacos.....62
4.8.6 Análise histopatológica.....63
4.8.7 Análise da colagênese.....64
4.8.8 Reação imunohistoquímica para IL-1, TNF-α, TGF-β e CD31.....65
4.8.9 Método de indução de morte e descarte da carcaça.....66
4.9 Análise estatística.....67
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....68
5.1 Caracterização química do extrato de L. ferrea L. por LC-MS.....68
5.2 Testes físico-químicos de controle de qualidade.....70
5.2.1 Teste de centrifugação.....71
5.2.2 Teste de pH.....73
5.2.3 Teste de densidade.....75
5.2.4 Teste Reológico.....77
5.2.5 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes e microrganismos patogênicos – Controle microbiológico da pomada orabase.....82
5.2.6 Avaliação das características organolépticas.....82
5.3 Testes de atividade cicatricial, de colagênese e apoptose de fibroblastos em mucosa, análise histopatológica e imunohistoquímica em jugal de ratos diabéticos.....83
5.3.1 Avaliação da indução diabética e avaliação clínica.....83
5.3.1.1 Diâmetro ulcerativo.....84
5.3.2 Avaliação da diferença de peso corpóreo.....88
5.3.3 Análise histopatológica.....91
5.3.4 Análise da colagênese (colágeno total, colágeno tipo I, colágeno tipo III) 94
5.3.5 Reação imunohistoquímica para IL-1, TNF-α, TGF-β e CD31.....100
6. CONCLUSÃO.....113
REFERÊNCIAS.....114
ANEXO..... 132
ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFC.....132

1. INTRODUÇÃO

A *Diabetes Melittus* (DM) é uma doença metabólica caracterizada por hiperglicemia decorrente da secreção defeituosa/insuficiente de insulina e/ou em sua ação. Segundo a *International Diabetes Federation* (2017) essa patologia acomete proporções epidêmicas mundiais chegando a apresentar estimativas de 425 milhões de pessoas, sendo 8,8% da população mundial entre 20 e 79 anos; se estas estimativas crescerem a projeção será superior a 628,6 milhões de pessoas com 79% dos acometidos em países em desenvolvimento até 2045. O paciente acometido por esta patologia torna-se vulnerável a diversas complicações associadas como alterações microvasculares e macrovasculares, incluindo danos teciduais e celulares (GOIS *et al.*, 2021; SBD, 2020).

Esta doença sistêmica pode afetar diretamente ou indiretamente a saúde bucal, dentre as condições orais afetadas podemos citar a alteração na produção e composição salivar através da modulação de neurotransmissores como a acetilcolina e modificações de algumas proteínas que levam a problemas como a hipossalivação e consequentemente xerostomia, fator que pode desencadear úlceras, muitas vezes de caráter crônico. (KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; MAURI-OBRADORS *et al*., 2017; PETERSMANN *et al*., 2019; PRADO & VACCAREZZA, 2013; ROHANI, 2019).

O retardo cicatricial em pacientes diabéticos que apresentam deficiência plaquetária e/ou em algum fator do processo de coagulação ou inflamatório pode influenciar no processo reparador de algumas lesões bucais, como as feridas ulcerativas. Diversos fatores locais e sistêmicos como a idade, estresse, medicamentos, nutrição, infecção comprometendo ainda mais o processo cicatricial, tornando-se fortes preditores no desenvolvimento de feridas crônicas e no retardo da neoformação tecidual (GOIS *et al*., 2021; VIEIRA & ARAÚJO, 2018).

O estado de hiperglicemia, característico da DM, está relacionado à superprodução de Fator de Necrose Tumoral- alfa (TNF-α) (SALVI *et al*., 1997; RASHID *et al*., 2004). Sabe-se que essa citocina pode atuar, além de processos imunológicos e inflamatórios, na reparação dos tecidos. A produção fisiológica desregulada de TNF-α provoca uma diminuição na contração cicatricial das feridas, o que pode ocorrer devido à diminuição na expressão do colágeno tipo I e III (RAPALA *et al*., 1991). Os fibroblastos são essenciais ao processo de reparação tecidual, sendo sua proliferação e crescimento importantes para a manutenção de uma pele normal (YU *et al*., 2011). Sendo assim, apoptose de fibroblastos induzida pelo aumento dos níveis de TNF-α parece estar envolvida no atraso na cicatrização dos tecidos observado em pacientes

diabéticos e, portanto, a inibição farmacológica dessa via poderia auxiliar no processo de cicatrização tecidual.

As lesões ulcerativas bucais, conhecidas como aftas, constituem uma doença de etiologia desconhecida bastante prevalente na prática clínica odontológica. Muitas hipóteses etiológicas são propostas, como hereditariedade, traumas variados sobre a mucosa bucal, alimentação, fatores imunológicos e hormonais, entre outros. Estima-se que 90% dos casos clínicos abrangem pacientes do sexo feminino, apresentando surtos esporádicos ou recorrentes, com sintomatologia discreta à moderada. No que se refere às ulcerações aftosas menores, principalmente as de origem traumática (ABID & NASER, 2021; GASMI *et al*., 2021; O'NEIL & SCULLY, 2012; VAILLANT & SAMIMI, 2016).

A reparação tecidual de feridas é um processo inflamatório complexo a fim de restabelecer a hemostasia tecidual, envolvendo uma cascata de eventos celulares, fisiológicos, moleculares e bioquímicos que interagem nos mais diversos sistemas corporais. Basicamente, o processo reparador envolve 5 etapas principais: inflamação, proliferação celular, formação do tecido de granulação, contração e remodelação da ferida; ou em 3 fases, didaticamente divididas em fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação ou de maturação. A liberação de diversos mediadores vasoativos e quimiotáticos conduzem o processo de cicatrização após a interação das células inflamatórias na região da ferida (OLIVEIRA & DIAS, 2012; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007).

Quando se deseja tratar lesões ulceradas em mucosa bucal, de origem não infecciosa, existem vários tratamentos farmacológicos ou não-farmacológicos disponíveis para oferecer um controle álgico e inflamatório ao paciente, contudo o tratamento padrão-ouro preferencial tem sido através do uso de pomadas a base de corticosteroides sintéticos (Acetonido de Triancinolona a 1%), geralmente em orabase (ABID & NASER, 2021; FANTOZZI *et al*., 2019; HAMISHEHKAR *et al*., 2015; NASRY *et al*., 2016; SANTOS *et al*., 2019).

Os corticosteroides são comumente prescritos para o tratamento de sintomas dolorosos destas lesões (CAMPISI *et al*., 2007; CHAVAN *et al*., 2012). No entanto, resultados contraditórios têm sido relatados na literatura sobre os efeitos dessa modalidade terapêutica no processo de cicatrização (PETROIANU *et al*., 2009; ALBERTI, VASCONCELLOS, PETROIANU, 2012).

Em contraste com os medicamentos já inseridos no mercado farmacêutico para o tratamento de diversas patologia bucais, diversas espécies de plantas medicinais vêm sendo estudadas demonstrando ações terapêuticas contra diversos distúrbios bucais, exibindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, analgésicas, anti-hemorrágicas, já

identificadas cientificamente (CONDE *et al*., 2015; DROZINO *et al*., 2017; LINS *et al*., 2022; MARTÍNEZ, GÓMEZ & SOOK OH, 2017; OLIVEIRA *et al*., 2010; OLIVEIRA *et al*., 2014; SAMPAIO *et al*., 2009).

O Brasil representa a maior parcela da flora mundial, cerca de 20% da biodiversidade genética do mundo está presente em nosso país, sobretudo na Amazônia. Segundo o Ministério da Saúde (MS), entre as práticas integrativas e complementares realizadas no Sistema Único de Saúde (SUS), o uso das plantas medicinais e a fitoterapia predomina e são realizadas, em sua maioria, na atenção primária à saúde. O Brasil possui inúmeras vantagens e oportunidades para o desenvolvimento dessa terapêutica, como o uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento tradicional e tecnologia para validar cientificamente esse conhecimento; entretanto, se não houver políticas governamentais capazes de produzir impactos sociais, a prática em questão permanecerá indeterminada. (BRASIL, 2012; RATTMANN *et al*., 2022; SANTOS, 2011; SILVA & SANTANA, 2018)

Em face disso, o marco legal proporcionou uma crescente institucionalização das práticas integrativas e complementares no SUS, com a criação de legislações específicas no país para garantir recursos para sua implementação. Em 2006, foram criadas a Política Nacional de Práticas Integrativas e complementares (PNIC) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) para o SUS, possibilitando a inclusão de mais uma terapêutica ao arsenal de possiblidades de tratamento à disposição dos profissionais de saúde (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012; GURGEL JUNIOR, GURGEL & FIGUEIREDO, 2014; RATTMANN *et al*., 2022).

As plantas medicinais têm como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo ser humano. A descoberta de substâncias ativas, muitas vezes, já confirmadas pelo uso popular e comprovadas cientificamente, por anos, passaram a gerar interesse e incentivos institucionais e governamentais (BARKAT *et al*., 2021; CASTRO *et al*., 2014; JÜTTE *et al*., 2017).

A fitoterapia é um método de tratamento de enfermidades que utiliza drogas vegetais: planta medicinal, ou suas partes, que contenham substâncias ou classes de substâncias que são responsáveis pela ação terapêutica. É caracterizada pela sua utilização nas mais diversas formas farmacêuticas, desde que sua eficácia e segurança sejam validadas para garantir sua adequada reprodutibilidade e garantir a qualidade do produto farmacêutico (ANVISA, 2013; BARKAT *et al*., 2021).

Observa-se um aumento da utilização de fitoterápicos no tratamento de diversas afecções bucais, incluindo as lesões ulcerativas bucais (DUARTE *et al*., 2011). Esses produtos

têm demonstrado efeitos positivos em um ou mais estágios do processo cicatricial de feridas, principalmente com resultados promissores quando testado em lesões traumáticas bucais. Neste contexto, a *Libidibia ferrea* L. já foi testada em ratos normossistêmicos como possível alternativa terapêutica para o tratamento destas lesões (MELO, 2019; MENDONÇA *et al*., 2009)

A *Libidibia ferrea* L. (*ex Caesalpinia ferrea* Mart.) conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, tornou-se bastante difundida na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas antimicrobianas, analgésicas, anti-inflamatórias, cicatrizante, antiulcerativa, hemostática, expectorante, anti-helmíntica, cardiônica, dentre outras, o que justifica o grande interesse dos pesquisadores por esta planta (COSTA, GUILHON-SIMPLICIO & SOUZA, 2015; DROZINO *et al*., 2017; LINS *et al*., 2022; MACEDO *et al*., 2020; OLIVEIRA *et al*., 2010; OLIVEIRA *et al*., 2013; PEREIRA *et al*., 2012; SAMPAIO *et al*., 2009).

Não obstante a esse ponto, o medicamento fitoterápico deve ser produzido com um controle de qualidade rigoroso e envolver várias etapas que vão desde os levantamentos etnofarmacológicos e de utilização, documentações tecnocientíficas, até a obtenção da matéria-prima, passando por todo processo de produção, culminando com a análise do produto final, contudo sem garantir a eficácia do produto, entretanto torna-se um fator primordial ao mesmo (BARKAT *et al*., 2021; BRASIL, 2010).

O referido controle de qualidade é primordial para garantir a eficácia e segurança do produto e compreende uma série de análises da sua matéria-prima e da formulação finalizada (análise físico-químicas e microbiológicas), como ensaios farmacológicos pré-clínicos e clínicos dos efeitos biológicos recomendados, bem como seus efeitos tóxicos (BARKAT *et al*., 2021; BRASIL, 2010; CALIXTO, 2010; CARVALHO *et al*., 2012; CARVALHO *et al*., 2014; CARVALHO *et al*., 2018).

Estudos anteriores realizados por Melo (2019) com uma formulação a base de *Libidibia ferrea* L. demonstraram ser de fácil manipulação e manuseio podendo sua fórmula farmacêutica estar destinada a ser aplicada sobre a pele ou certas mucosas com a finalidade de exercer um efeito local permitindo a penetração dos compostos farmacológicos adequadamente. Evidenciou-se, também a eficácia da pomada onde os ratos do grupo-teste apresentaram o processo cicatricial mais rápido e eficiente em relação aos demais grupos, confirmando que a utilização de *Libidibia ferrea* L. no tratamento de feridas mostra-se benéfico, principalmente nos primeiros dias, favorecendo o reparo tecidual em ratos normossistêmicos.

A inovação tecnológica farmacêutica tem transformado o desenvolvimento de medicamentos e tratamentos, proporcionando avanços significativos em diversas áreas,

incluindo a odontologia, envolvendo a criação de novos métodos de administração de medicamentos que podem melhorar a eficácia e segurança dos tratamentos e a conveniência para o consumidor final do produto farmacêutico. Essas inovações procuram melhorar a experiência do paciente, aumentando a adesão ao tratamento, reduzir reações adversas e maximizar a eficácia terapêutica, sendo fundamental assegurar que o mesmo trará benefícios significativos à sociedade, ciência ou outras áreas afins.

O desenvolvimento de novas formas farmacêuticas envolve a criação de novos métodos de administração de medicamentos e inclusão de novos princípios ativos farmacológicos. As formas semissólidas para a cavidade bucal, como as pomadas em orabase, prolongam sua adesão à mucosa e melhoram a efetividade farmacológica para diversas afecções bucais, criando uma barreira protetora na pele, mantendo a hidratação e permitindo a liberação prolongada do medicamento; essas formulações continuam sendo uma área vital de pesquisa e inovação na indústria farmacêutica, oferecendo soluções terapêuticas eficazes e convenientes para uma ampla gama de patologias.

Portanto, considerando o potencial terapêutico existente nas plantas medicinais, especificamente a eficácia cicatricial já comprovada da *Libidibia ferrea* L., assim como a prevalência destas lesões traumáticas e do desconforto que causam aos pacientes, considera-se importante novas opções terapêuticas para o seu tratamento. Sendo assim, a proposta deste trabalho foi caracterizar uma formulação a base de *Libidibia ferrea* L., em orabase, obedecendo às exigências físico-químicas de controle de qualidade, seguindo orientações de padronização e normas das boas práticas de fabricação de pomadas da Farmacopeia Brasileira e da Agencia de Vigilância Sanitária, bem como avaliar a atividade cicatricial em úlceras induzidas na mucosa oral de ratos portadores de *diabete mellitus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões ulcerativas da cavidade bucal e seu processo de reparação tecidual

O termo "*aphtae*" é derivado da palavra grega *aphthi*, que significa "incendiar ou "inflamar", o qual foi usado pela primeira vez por Hipócrates que descreveu a dor associada a um transtorno bucal existente durante um certo período de tempo (COMPILATO *et al*., 2009). A estomatite aftosa é uma doença multifatorial que afeta cerca de 15 a 25% da população mundial pré-existindo diversos fatores envolvidos em sua patogênese (EDGAR SALEH & MILLLER, 2017; NASRY *et al*. 2016; VAILLANT & SAMIMI, 2016).

Segundo Neville *et al*. (2016) lesões agudas e crônicas resultante de um trauma mecânico são frequentemente encontradas na mucosa bucal. O trauma agudo ou crônico na mesma pode resultar em ulcerações superficiais, podem permanecer um longo período de tempo, contudo, geralmente cicatrizam em poucos dias. Na maioria dos casos, há uma fonte adjacente traumática, e sua apresentação clínica pode ter similaridades com outras lesões, principalmente quando a mesma não responde ao tratamento, sendo necessário o diagnóstico diferencial (biópsia).

Clinicamente, as lesões ulcerativas apresentam três aspectos, normalmente sintomáticos, como: minor, major e herpetiforme. A do tipo minor é a mais frequente, com prevalência de 80% a 90%, caracteriza-se por lesões pequenas, únicas ou múltiplas, ovoides ou arredondadas com base crateriforme, contorno bem definido e halo eritematoso com material amarelado purulento. A major, conhecida como afta de "Sutton", apresenta um diâmetro de 10 mm ou mais que deixam cicatrizes após a fase de reparação podendo durar até 42 dias, localizando-se, prevalentemente, no palato mole e mucosa labial, é considerada o tipo mais grave. A menos comum é a do tipo herpetiforme, são pequenas e numerosas (chegando a 100 lesões ao mesmo tempo) variando entre 1 a 3mm podendo ulcerar e persistir por cerca de 10 dias (FITZPTRICK, COHEN & CLARK, 2019; GASMI *et al*., 2021; JU *et al*., 2019; KIGNEL, 2007; NEVILLE *et al*., 2016; SCULLY; GORSKY & LOZADA-NUR, 2002; ZUNT, 2002).

Ao analisar as características clínicas das lesões Compilato *et al*. (2009), Kignel (2007), Gasmi *et al*. (2021) e Neville *et al*. (2016) relataram que normalmente são de aspecto ovóides e sintomáticas, sendo limitadas à área submetida ao dano e podem apresentar-se com um centro necrótico branco-amarelado rodeado por uma banda larga eritematosa. Na grande maioria dos casos medem cerca de 1 cm e evoluem para cura espontânea em um período que pode variar de 10 a 14 dias, sem deixar cicatriz. Na maior parte das vezes, as úlceras bucais aparecem

clinicamente de forma muito semelhante, mesmo que sua etiopatogenia possa variar, podendo ser a consequência clínica de doenças sistêmicas, por isso a necessidade de um diagnóstico diferencial, associando a história clínica, exames extra e intrabucais e exames complementares são de extrema importância para um diagnóstico adequado.

Em uma visão microscópica, observam-se três estágios da doença: a fase pré-ulcerativa com um infiltrado de linfócitos na lâmina própria acompanhado de degeneração das células epiteliais suprabasais; um estágio ulcerativo, mais avançado, com a presença de um edema e degeneração epitelial progredindo para uma úlcera com uma membrana de fibrina recobrindo-a e consequente aumento dos infiltrados inflamatórios; e, a última fase, de reparação, observa-se a regeneração do epitélio (FITZPTRICK, COHEN & CLARK, 2019).

Neville *et al*. (2016) referem as características histopatológicas das ulcerações traumáticas com a presença de membrana fibrinopurulenta (fibrina e neutrófilos) de espessura variável. O epitélio superficial contíguo pode ser normal ou exibir regiões hiperplásicas com ou sem hiperceratose. A área mais profunda ulcerativa apresenta tecido de granulação com infiltrado inflamatório misto (linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e histiócitos), além disso o tecido conjuntivo vascular desta região pode apresentar hiperplasia e causar elevação superficial.

As lesões ulcerativas comumente presentes na cavidade bucal são caracterizadas pela perda de continuidade tecidual mucoepitelial, acarretando alterações na estrutura anatômica ou função fisiológica dos tecidos afetados. As mesmas podem ser classificadas quanto à causa, em: cirúrgicas, não cirúrgicas; segundo o tempo de reparação, em agudas e crônicas, e de acordo com a profundidade, em relação à extensão da parede tissular envolvida (epiderme derme, subcutâneo e tecidos mais profundos, como músculos, tendões, ossos e outros) em graus, I, II, III e IV como demonstrado no esquema abaixo (Figura 1) (BILODEAU & LALLA, 2019; BRASIL, 2002; KIGNEL. 2007; NEVILLE *et al*., 2016).

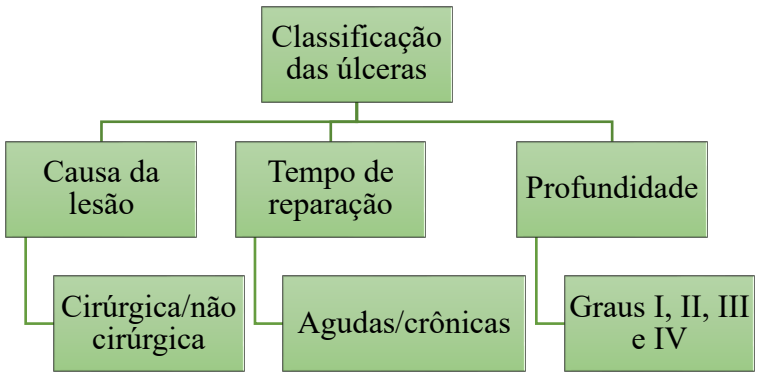


Figura 1. Classificação ulcerativa. FONTE: Brasil, 2002.

Outras classificações podem ser encontradas na literatura, como por exemplo a classificação em úlceras primárias e secundárias; onde a primária a lesão não é precedida por outra lesão, e a secundária que se originam através da ruptura de uma vesícula ou bolha (REGEZI, SCIUBBA & RICHARD, 2008).

A úlcera aguda geralmente surge após um trauma e apresenta curta duração (7 a 10 dias), se o fator etiológico traumático for removido, sua manifestação clínica caracteriza-se por edema, graus variados de dor, halo eritematoso e centro amarelado. Já a úlcera crônica permanece na cavidade bucal por mais tempo, podendo apresentar uma sensação álgica mais fraca ou até inexistente, com lesões recobertas por uma membrana amarelada central com margens elevadas (hiperqueratose). Uma vez que a úlcera se manifesta clinicamente, sujeita-se a irritação pela ação da microbiota oral e salivar (BASCONES-MARTINEZ, FIGUERO-RUIZ & ESPARSA-GÓMEZ, 2005; REGEZI, SCIUBBA & RICHARD, 2008; VAILLANT & SAMIMI, 2016).

Certas lesões bucais podem ter origem sistêmica, contudo, em sua maioria, são originadas devido a uma irritação mecânica, térmica, elétrica ou química na mucosa bucal. A mucosa bucal é uma barreira de proteção ao organismo constituída de células epiteliais em sua camada externa e sustentada por tecido conjuntivo, esta integridade tecidual pode ser alterada devido a um estímulo irritativo mecânico, térmico, elétrico ou químico, e, dependendo da intensidade e tempo do mesmo podem ser observadas diversas alterações, principalmente no tecido epitelial. Os estímulos mecânicos (dentes fraturados, próteses mal adaptadas, iatrogenias diversas) produzem vários tipos de lesões (únicas ou múltiplas), denominadas de lesões ulcerativas traumáticas, úlceras agudas mais comuns (ENDO *et al*., 2006; FITZPTRICK, COHEN & CLARK, 2019; GASMI *et al*., 2021; JU *et al*., 2019; MINHAS *et al*., 2019; MUNOZ *et al*., 2009).

A irritação química por exposição as substancia ácidas ou básicas também pode desenvolver uma lesão traumática ulcerativa, principalmente por aqueles pacientes que apresentam dificuldade de deglutição. Queimaduras elétricas são raras, mas alguns casos podem ser relatados na literatura em pacientes pediátricos com mordeduras de cabos ou tomadas elétricas; bem como queimaduras térmicas através do contato com alimentos quentes ou muito frios, aparecendo principalmente em região de língua e palato (MUNOZ *et al*., 2009; RAWAL, CLAMAN & KALMAR, 2004).

As lesões aftosas são normalmente encontradas em superfícies não queratinizadas, tais como a mucosa jugal, bordos da língua e lábios, as quais podem ser facilmente lesionadas pelo

movimento mastigatório. Porém, podem ocorrer lesões na gengiva, palato e fundo de sulco vestibular por outras fontes de irritação, como pelo trauma da escovação (NEVILLE *et al*., 2016).

Cavalcante *et al*. (2011) estabeleceram um modelo experimental de úlcera traumática em mucosa jugal de ratos para utilização em testes de terapias complementares. Foram utilizados 60 ratos, adultos, machos, pesando entre 250 a 300g. A ulceração na mucosa jugal esquerda foi provocada por meio da abrasão desta com uma lâmina de bisturi número 15. Os animais foram observados por um período de 10 dias, sendo pesados e suas escoriações mensuradas. As características histológicas foram analisadas e descritas adotando escores para comparação dos estágios da fase da úlcera. Durante os cinco primeiros dias os animais perderam peso. A área da úlcera regrediu linearmente com o tempo, estando quase que completamente cicatrizada ao final de dez dias. Os grupos do 1º, 2º e 3º dias tiveram comportamento semelhante havendo uma diminuição dos escores a partir do 4º dia. O modelo de úlcera na mucosa jugal de ratos proposto pode ser considerado eficaz, apresentando reprodutibilidade confiável e baixo custo.

Após a superfície do epitélio ser lesionada pode-se observar o início do processo de cicatrização sendo um processo natural mediado por uma organização dos tecidos. A reparação tecidual tem a finalidade de restabelecimento da homeostasia tecidual através da substituição do tecido lesado por um tecido conjuntivo vascularizado, independente da origem etiológica. Este processo desencadeia uma cascata de eventos celulares e moleculares que são regulados por mediadores bioquímicos, onde as células sanguíneas entram em contato com o colágeno e outras substâncias da matriz extracelular gerando a degranulação das plaquetas e ativação das cascatas inflamatórias (cascata de coagulação e sistema complemento), liberando mediadores vasoativos e quimiotáticos que irão nortear o processo de reparação tecidual. Este processo de cicatrização tecidual é classificado em fases que não apresentam limites definidos contudo são sobrepostas pelo tempo em: fase inflamatória, fase de proliferação ou de granulação e fase de remodelação (CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; CLARK, 2005; FITZPTRICK, COHEN & CLARK, 2019; GASMI *et al*., 2021; JU *et al*., 2019; OLIVEIRA & DIAS, 2012; VELNAR, BAILEY e SMROKOLJ, 2009).

Após o dano tecidual, as alterações celulares e vasculares com a liberação de mediadores vasoativos promovem uma vasoconstrição imediata, uma cobertura primária de fibrina restabelece a hemostase e fornece um ambiente para secreção de fatores de crescimento, citocinas e elementos da matriz extracelular. O coágulo formado minimiza a perda sanguínea para o espaço extravascular, protegendo o organismo contra a penetração de agentes externos

e disponibilizando uma matriz provisória (trombo vermelho) para a neoformação tecidual (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BARBUL, 2006; GONZALES *et al*., 2016; KUMAR *et al*., 2005; OLIVEIRA & DIAS, 2012).

A primeira fase (fase inflamatória), inicia-se logo após a lesão, a plaqueta ativada aumenta a ação da protrombinase promovendo a produção de trombina e o ADP liberado das hemácias amplificam a agregação plaquetária liberando substâncias vasoconstritoras, principalmente tromboxana A2 e prostaglandinas, através do ácido araquidônico. As plaquetas atraídas por proteínas de adesão (fibrinogênio, fator de von Willebrand, vitronectina, fibronectina e trombospondina) liberam grânulos que possuem fatores de crescimento (TGF-β), fator de crescimento derivados das plaquetas (PDGF), fator de crescimento derivado dos fibroblastos, fator de crescimento epidérmico (EGF), ativador e indutor de plaquetas (PAF) além das substâncias vasoconstritoras citadas que atraem neutrófilos a região lesionada. Com isso, a resposta inflamatória inicia-se com a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, promovendo a quimiotaxia celular (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BROUGHTON et al., 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; OLIVEIRA & DIAS, 2012; RODRIGUES *et al*., 2019).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar na região afetada, atingindo sua maior concentração em torno de 24 horas após a lesão, aderindo-se as paredes através das ligações com as selectinas e produzindo radicais livres que irão causar a destruição bacteriana. Após 48 a 96 horas, os neutrófilos são substituídos por macrófagos e tornam-se as principais células antes dos fibroblastos migrarem para iniciarem a sua replicação, tendo um papel primordial no término do desbridamento que se iniciou pelos neutrófilos, além de secretar citocinas e fatores de crescimento para a angiogênese, fibroplasia e síntese de matriz extracelular (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BROUGHTON *et al*., 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; OLIVEIRA & DIAS, 2012; RODRIGUES *et al*., 2019).

O recrutamento de mais neutrófilos é influenciado também pela produção de quimiocininas locais, o CTAP-III é convertido em NAP-2 e exportado para o microambiente onde ativam as células vasculares e secretam GRO-a. A interação entre as proteínas plasmáticas com os mediadores inflamatórios gera bradicinina que apresenta propriedades vasoativas e nociceptivas e induz a metabolização de ácido araquidônico para eicosanóides. Por ação dos eicosanóides (leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas), citocinas (principalmente a IL-1 e TNF-α) as células dos vasos não lesados são induzidas a expressarem mais proteínas de adesão para leucócitos. A produção de IL-8 abaixo da superfície da ferida estimula uma segunda resposta migratória para a região profunda da ferida (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005;

BROUGHTON *et al*., 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; OLIVEIRA & DIAS, 2012; RODRIGUES *et al*., 2019).

Em torno do 4° dia inicia a fase proliferativa (segunda fase) que geralmente se estende até a segunda semana, subdividindo-se em quatro etapas principais: epitelização, angiogênese, formação do tecido de granulação e deposição de colágeno. Caso a membrana basal estiver intacta, as células epiteliais migram e a epiderme é reparada em 3 dias, contudo caso ela esteja lesada as células epiteliais das bordas da ferida começam a proliferar para restabelecimento da barreira protetora. Durante a angiogênese, estimulada pelo TNF-α, as células endoteliais migram e formam capilares. Para formação do tecido de granulação há presença de fibroblastos (ativados por PGDF estimulando a proliferação celular, quimiotaxia e síntese de matriz) e células endoteliais, o TGF-β estimula os fibroblastos a produzirem o colágeno tipo I e transforma-se em miofibroblastos cuja função principal é contração da lesão. Os principais fatores de crescimento envolvidos no processo de reparação nesta fase podem ser observados em detalhes na tabela 1 abaixo (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BROUGHTON *et al*., 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; OLIVEIRA & DIAS, 2012).

Tabela 1. Fatores de crescimentos envolvidos na reparação tecidual.

Fator de crescimento	**Produzido por (Célula)**	**Função**
TNF-α	Monócitos e linfócitos	Proliferação de fibroblastos, quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos.
TGF-α	Matriz extracelular	Proliferação celular e estímulo epitelial.
TGF-β	Plaquetas, matriz extracelular	Mitogênico para fibroblastos e formação de tecido de granulação.
PGDF	Plaquetas	Quimiotaxia para neutrófilos, monócitos e fibroblastos; e proliferação de fibroblastos e produção de matriz extracelular.
VEGF	Queratinócitos e macrófagos	Angiogêneses e a proliferação de células endoteliais.
IL-1	Mononucleares	Proliferação de fibroblastos.

Os fibroblastos migram e são ativados das margens da ferida para o seu centro, sendo os principais componentes do tecido de granulação. Com o aumento do número de fibroblastos ativados para a produção de colágeno, a matriz extracelular começa a ser substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico (fibroplasia) com neovascularização da região. O tecido de granulação formado é suportado por uma matriz frouxa de fibronectina, ácido hialurônico e colágeno tipos I e II, é edematoso e com muitos espaços vazios os quais são extremamente

exsudativos e sangram com facilidade. Estas células são encontradas alinhadas ao redor de depósitos da nova matriz extracelular, fazendo uniões célula a célula e gerando força de tensão auxiliando na contração da ferida onde o ressecamento da sua crosta superficial diminui o tamanho da mesma e arrasta o tecido a ela aderido. Ao final desta fase, o leito da lesão está totalmente preenchido pelo tecido de granulação, a circulação é restabelecida e a rede linfática regenerada, o tecido de granulação é enriquecido com mais fibras colágenas o que começa a dar à região a aparência de cicatriz (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BROUGHTON *et al.*, 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; OLIVEIRA & DIAS, 2012; RODRIGUES *et al*., 2019).

A característica principal da fase de maturação ou remodelação (terceira fase) é a deposição organizada de colágeno de forma paralela, fibroblastos e leucócitos secretam colagenases que promovem a lise da matriz antiga. Por volta do 10° dia, a lesão está totalmente preenchida pelo tecido de granulação que está mais enriquecido com fibras de colágeno e começa a adquirir a aparência de massa fibrótica. O colágeno é a proteína mais abundante do tecido conectivo, os tipos de colágenos do tecido conjuntivo são helicoidais (a rica presença de glicina e prolina são fundamentais para manter a estrutura de tripla hélice). O colágeno tipo I é o mais frequente em ossos e tendões e o tipo III em tecidos moles, já o tecido de granulação expressa 30 a 40 % de colágeno tipo III, sendo o principal componente da matriz extracelular dos tecidos. A degradação do colágeno inicia-se precocemente e é muita ativa durante o processo inflamatório mediada por colagenases específicas séricas e metaloproteinases (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BROUGHTON *et al*., 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; MESQUITA *et al*., 2020; OLIVEIRA & DIAS, 2012; WILKINSON & HARDAMN, 2020).

Os eosinófilos aparecem nesta última fase e podem estar relacionados à produção de fatores de crescimento, na qual a depender do tipo de tecido pode durar meses e é responsável pela força de tensão e pela diminuição da cicatriz e do eritema. O número de vasos e da atividade celular diminuem levando a maturação da cicatriz, gradativamente os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos e regulares, assim a lesão torna-se mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação, a maioria das células desaparecem, observando-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando, por fim, o tecido cicatricial (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BALBINO *et al*. 2005; BROUGHTON *et al*., 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; OLIVEIRA & DIAS, 2012; WILKINSON & HARDAMN, 2020).

Os mediadores químicos tem um papel fundamental no processo de reparo, as citocinas (IL-1 e TNF-α) induzem a produção de óxido nitroso para a migração de neutrófilos, o PDGF e o TGF-β também participam ativamente como fator de crescimento com propriedade quimiotática sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos. A IL-6, IL-8 e o TNF-α são mediadores fundamentais na indução mitótica de queratinócitos e quimioatrativos sobre neutrófilos e macrófagos, já a IL-10 é um dos mais conhecidos sinalizadores negativos da inflamação atuando como papel limitador e finalizador da resposta inflamatória, regulando o crescimento ou diferenciação de várias células do sistema imune (BALBINO, PEREIRA e CURI, 2005; BROUGHTON *et al*., 2006; CAMPOS, BORGES-BRANCO & GROTH, 2007; GASMI *et al*., 2021; MESQUITA *et al*., 2020; OLIVEIRA & DIAS, 2012; WILKINSON & HARDAMN, 2020).

Independente dos processos fisiológicos e bioquímicos que ocorrem durante o processo de reparo tecidual a escolha da terapêutica para úlceras aftosas recorrentes e traumáticas é inespecífica, baseia-se na gravidade, frequência, sintomatologia e promoção do processo cicatricial, utilizados opções terapêuticas paliativas como laserterapia, anti-inflamatórios, imunomoduladores, analgésicos, antibióticos e anestésicos além de medicamentos com propriedades naturais e homeopáticos para restabelecimento das funções orais normais (BELENGUER-GUALLAR; JIMENEZ-SORIANO; CLARAMUNT-LOZANO, 2014; FITZPTRICK, COHEN & CLARK, 2019; GASMI *et al*., 2021; HOSEINPOUR, 2011; JU *et al*., 2019; KIGNEL *et al*., 2007).

2.2 *Diabetes mellitus* (DM) e suas manifestações na cavidade bucal

A saúde bucal pode ser influenciada por doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, doença autoimunes, incluindo a DM. A diabetes desenvolve uma disfunção do sistema imunológico, envolvendo a células leucocitárias polimorfonucleares, função dos linfócitos T, atividade bacteriana, alteração da função antigênica podendo ocasionar diversas alterações bucais relacionada a estas funções fisiológicas (DEBNATH *et al*., 2022; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LUO *et al*., 2022; MAURI-OBRADORS *et al*., 2017; PRADO & VACCAREZZA, 2013).

As doenças crônicas não transmissíveis representam mundialmente cerca de 38 milhões de óbitos por ano, principalmente em países em desenvolvimento. No Brasil, podemos destacar dentre elas as doenças do aparelho circulatório, neoplasias, doenças respiratórias crônicas e a diabetes mellitus. O *diabetes mellitus* é uma doença metabólica de etiologia múltipla decorrente

da deficiência/insuficiência de insulina ou da sua incapacidade de realizar suas funções fisiológicas. Em consequência principalmente do distúrbio dos carboidratos, ocorre uma hiperglicemia com diversas complicações cardiovasculares, neurológicas, renais, oftalmológicas e bucais, especialmente nos casos não controlados e crônicos (GOIS et al., 2021; GROSS *et al*., 2002; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LUO *et al*., 2022; PETERSMANN *et al*., 2019).

Para um diagnóstico mais preciso a sintomatologia deve sempre ser associada aos exames complementares laboratoriais como glicemia de jejum, curva glicêmica, urina, entre outros. Os valores de glicemia baseiam-se no risco de complicações, uma glicemia elevada promove maior risco para complicações crônicas, sendo assim o controle glicêmico do paciente torna-se necessário para preveni-las. O teste de glicemia de jejum apesar de específico apresenta baixa sensibilidade para afastar o diagnóstico da diabetes, sendo necessário solicitar concomitantemente o teste oral de sobrecarga com glicose ou hemoglobina glicada/glicosilada (DEBNATH *et al*., 2022; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; PETERSMANN *et al*., 2019).

A classificação etiológica é de extrema importância para o diagnóstico precoce, melhor tratamento e controle, prevenindo assim, o aparecimento de complicações agudas e crônicas. A sua classificação foi modificada em 4 classes clínicas: na diabetes tipo 1 ou insulinodependentes ocorre uma destruição de células β pancreáticas, decorrentes de doenças autoimunes ou idiopáticas, levando a deficiência absoluta de insulina, necessitando de tratamento com insulina exógena diária; na diabetes tipo 2 ou não insulinodependentes ocorre um defeito na ação insulínica (resistência insulínica), na secreção pancreática de insulina (deficiência insulínica relativa) e na regulação da produção hepática de glicose (resistência insulínica no fígado) por uma interação de fatores genéticos e ambientais, como obesidade; na diabetes gestacionais ocorre devido um grau de intolerância à glicose normalmente no início gestacional, podendo persistir após o parto; e, nos outros tipos específicos envolvem defeitos genéticos, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, indução por drogas ou outras síndromes (concomitantemente o teste oral de sobrecarga com glicose ou hemoglobina glicada/glicosilada (DEBNATH *et al*., 2022; GROSS *et al*., 2002; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; PETERSMANN *et al*., 2019).

As alterações bucais em pacientes diabéticos são muito comuns, embora não específicas tem sua incidência e/ou progressão favorecida pelo descontrole glicêmico e suas implicações fisiológicas. Dentre as alterações podemos citar candidíase, xerostomia, hipossalivação, distúrbios gustativos, infecções bacterianas, hipocalcificação do esmalte, perda

precoce dos dentes, hálito cetônico, aumento da incidência de carie dentária, doença periodontal, dificuldade de cicatrização e ulcerações na mucosa bucal (DEBNATH *et al*., 2022; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LUO *et al*., 2022; MAURI-OBRADORS *et al*., 2017; PRADO & VACCAREZZA, 2013; ROHANI, 2019).

O fluxo salivar e a saliva são estimulados no sistema nervoso autônomo pela ação dos neurotransmissores colinérgicos acetilcolina e norepinefrina através dos nervos trigêmeos, facial e glossofaríngeo. A xerostomia ou hipossalivação relatada por 10 a 30% dos pacientes diabéticos pode causar úlceras e traumas dos tecidos moles e predispor a infecções. Em fases de descontrole metabólico ocorre um agravamento devida à desidratação aumentar os gradientes osmóticos dos vasos sanguíneos em relação às glândulas salivares, limitando a secreção da saliva (DEBNATH *et al*., 2022; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LUO *et al*., 2022; MAURI-OBRADORS *et al*., 2017; PRADO & VACCAREZZA, 2013).

A presença de infecções leva a estimulação da resposta inflamatória resultando em situação de estresse, que aumenta a resistência dos tecidos a insulina, piorando o controle da doença. Nos pacientes diabéticos, observa-se a depressão da atividade dos neutrófilos e macrófagos, menor eficiência da imunidade celular, alteração dos sistemas antioxidantes e menor produção de interleucinas, o que diminui importantes reguladores da quimiotaxia de neutrófilos (BASTOS et al., 2011; GRAVES, CORRÊA & SILVA, 2019; LUO et al., 2022; MAURI-OBRADORS et al., 2017; SANTOS, TEWARI & MENDES, 2019).

Não obstante, Brizeno *et al*. (2016) desenvolveram um modelo experimental utilizando a mesma metodologia proposta por Cavalcante *et al*. (2011) para avaliar úlceras bucais traumáticas em mucosa jugal de ratos diabéticos e para a indução diabética foi seguido o protocolo empregado por Seidel *et al*. (2003) onde injetou-se intravenosamente aloxana monohidratada 45mg/kg dissolvida em solução salina a 45mg/mL, coletando 2 mL de sangue através do plexo retro-orbital após 48 horas da indução diabética para confirmação dos níveis de glicose sanguínea, considerando o rato diabético quando o nível encontrava-se acima ou igual de 200 mg/dL. Após confirmação, o protocolo de indução ulcerativa foi utilizado para avaliação clínica, celular e molecular da cicatrização ulcerativa bucal entre ratos normossistêmicos e diabéticos.

O tempo de evolução da DM pode determinar maior risco para a progressão de complicações, o descontrole glicêmico leva ao estresse oxidativo e a disfunção endotelial, eventos precursores do dano tecidual e determinantes para o desenvolvimento de complicações microvasculares e macrovasculares, principalmente as microvasculares. Seguidamente após a lesão, inicia-se o processo interdependente e sobreposto de restauração de integridade tecidual

desencadeando complexos eventos bioquímicos e celulares que podem resultar no retardo cicatricial (GOIS *et al*., 2021; GROSS *et al*., 2002; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LUO *et al*., 2022; TAGLIARI *et al*., 2019).

Esta doença metabólica sistêmica altera a estrutura da membrana celular, modificando a resposta inflamatória por alterações quimiotáticas como fagocitárias das células de defesa, reduzindo a vascularização local. Há uma redução do fluxo em função da angiogênese deficiente, presença de altas concentrações de metaloproteinases (MMPS), neuropatia, alta probabilidade de infecção e resposta inflamatória, estresse oxidativo, formação excessiva de produtos de glicoxidação avançada, diminuindo o metabolismo e a entrega de nutrientes bem como a concentração de fatores de crescimento e anormalidades celulares que ajudam na progressão contínua da área lesionada (GOIS *et al*., 2021; GROSS *et al*., 2002; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LUO *et al*., 2022; MASI et al., 2016; TAGLIARI *et al*., 2019).

Nos diabéticos a fase inflamatória inicia-se lentamente, com a diminuição de células de defesa, menor atividade fagocitária, menor produção de citocinas e fatores quimiotáticos e geração de espécie reativa de oxigênio (ROS). Na fase proliferativa ocorre persistência das células inflamatórias as quais produzem elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores inflamatórios, redução de fatores de crescimento e diminuição da angiogênese, aumento das MMPS e diminuição dos seus inibidores, diminuição da síntese de colágeno e retardo da reepitelização. Na fase de remodelação as células inflamatórias ainda persistem com altos níveis de citocinas, de MMPS e ROS. A inflamação crônica exacerbada dos pacientes diabéticos contribui para que esta cicatrização seja lenta ou ausente, ocasionado a ulceração da lesão. O perfil celular encontrado nestas lesões é mais pró-inflamatório, com a presença de macrófagos clássicos, liberação de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6, TNF-α e LTB4 (BRIZENO *et al*., 2016; GOIS *et al*., 2021; GROSS *et al*., 2002; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LUO *et al*., 2022; MESQUITA *et al*., 2020; TAGLIARI *et al*., 2019).

Portanto, o processo de cicatrização em diabéticos encontra-se prejudicado pela deficiência no processo inflamatório e de coagulação assim como o aumento de mediadores inflamatórios, o desequilíbrio entre o acúmulo e degeneração de componentes da matriz extracelular pelo estresse oxidativo, fatores de crescimento como TGF-β, TNF-α, IL-6 e aumento de MMPS, diminuindo também a migração e proliferação de fibroblastos e queratinócitos. Esta deficiência imunológica aumenta progressão das úlceras traumáticas, úlceras aftosas e úlceras aftosas recorrentes, desenvolvendo infecções que podem ser fatais ao paciente diabético. Cabe ao profissional o conhecimento adequado da patologia e suas

manifestações bucais estando preparado para atuar em complicações durante o tratamento de pacientes diabéticos (BRIZENO *et al*., 2016; DEBNATH *et al*., 2022; GOIS *et al*., 2021; GROSS *et al*., 2002; KUDIYIRICKAL & PAPPACHAN, 2015; LIU &VELAZQUES, 2008; LUO et al., 2022; MAURI-OBRADORS *et al*., 2017; OLIVEIRA, LEÃO & ALCÂNTARA, 2021; PRADO & VACCAREZZA, 2013).

2.3 Plantas medicinais e Fitoterapia

Apesar do uso de produtos a base de plantas medicinais transcender 1500 a.C., cerca de 12 mil anos atrás, somente em 1978, a declaração da Alma-Ata reconhece o uso dos fitoterápicos com a finalidade de cura, terapêutica e paliativa, deparando-se em mitos, lendas e tradições em todos os tempos, independente de classe social e econômica, pelo mundo inteiro (BRASIL, 2012; IBIAPINA *et al*., 2014; MACIEL *et al*., 2002; OLIVEIRA; RATTMANN *et al*., 2022; SIMOES; SASSI., 2006).

Entretanto, até a metade do século XX, o uso de medicamentos de origem sintética tornou-se mais amplo que o uso de plantas medicinais, principalmente no continente ocidental, com destaque para os países industrialmente e economicamente desenvolvidos (GUPTA; BLEAKLEY; GUPTA 2008; SANTOS *et al*., 2011). De acordo com a OMS, 65 a 80% da população mundial nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil, devido à pobreza e à falta de acesso à medicina moderna, dependem essencialmente das plantas para seus cuidados de saúde primários. Contudo, a utilização crescente em todo mundo de preparações fitoterápicas, principalmente nos países europeus, americanos e australianos, representando em torno de 1,36 bilhões de dólares, podendo chegar a 60 bilhões da economia mundial (BARKAT *et al*., 2021; CALIXTO, 2005; CARVALHO *et al*., 2018; JÜTTE et al., 2017).

Os indícios sobre o uso de plantas medicinais são muito antigos, ao longo da história Ébers (1500 a.C.) descreve centenas de plantas medicinais no primeiro manuscrito conhecido, o papiro de Éber. Teofrasto (372-285 a.C.) catalogou cerca de 500 espécies vegetais. Hipócrates (460-36 a.C.), em sua obra considerada a mais clara e completa da antiguidade nos traz à utilização de plantas medicinais (BETTEGA *et al*., 2011; LIMA JUNIOR; DIMENSTEIN, 2006; RATES, 2001). Indícios arqueológicos demonstraram que por volta de 4000 a.C. os sumérios já utilizavam a papoula, de onde é extraído o ópio, conhecido há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas (HOSTETTMANN, 2003). Na época do descobrimento do Brasil, o emprego de ervas medicinais era prática indígena somado com os valores culturais advindos dos africanos e portugueses, no qual geraram uma rica cultura popular (ALMASSY JUNIOR *et al*., 2005; JÜTTE *et al*., 2017).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA n° 26/2014 define “fitoterápico como o produto obtido de matéria-prima vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie, vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal e planta medicinal é a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos” (BRASIL, 2014). De modo geral, os produtos fitoterápicos podem ser utilizados nas mais variadas formas farmacêuticas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcóolicas e infusões, que são conhecidas como chás. É de fundamental importância garantir a segurança e a eficácia de sua utilização como terapia complementar, resgatando e potencializando o conhecimento tradicional (BARKAT *et al*., 2021; CECHINEL-ZANCHETT, 2016; FRANCISCO, 2010; JÜTTE *et al*.,2017).

O uso das plantas e fitoterápicos tem sido estimulado por iniciativas do Ministério da Saúde. Em 2006, através da Portaria nº 971 e o Decreto n°5.813, publicada em Diário Oficial da União, é proposta a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), incluindo plantas medicinais e a fitoterapia, entre outras, como opção terapêutica no Sistema Único de Saúde. Posteriormente, também foram criados a Política Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos. Em 2008, foi publicada a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse do SUS (RENISUS), contendo 71 plantas (BRASIL, 2009; CARVALHO *et al*., 2012; CARVALHO *et al*., 2018; IBIAPINA *et al*., 2014).

Na odontologia, o uso da fitoterapia pelo cirurgião-dentista somente foi reconhecido e regulamentado como prática integrativa e complementar pela Resolução n°082/2008 pelo Conselho Federal de Odontologia. A utilização de plantas medicinais para tratar doenças bucais ou para tratar doenças sistêmicas com manifestações bucais ainda é pouco explorada (OLIVEIRA *et al*., 2007). Entretanto, nos últimos anos as pesquisas relacionadas a produtos naturais cresceram significativamente frente ao aumento pela busca por produtos com menor toxicidade, maior atividade farmacológica e biocompatíveis, além de custos mais acessíveis à população (CASTRO *et al*., 2014; FRANCISCO, 2010; LI & WENG, 2017; MARTÍNEZ, GÓMEZ & OH, 2017).

No Brasil 132 espécies de plantas medicinais (52 famílias botânicas) úteis para o tratamento de afecções odontológicas foram descritas por Oliveira *et al*. (2007). Dentre elas podemos citar Cravo da índia (*Syzigiuem aromaticum* L.), Romã (*Punica granatum* L.), Tanchagem (*Plantago major* L.), Amoreira (*Morus celtidofilia* L.), Sálvia (*Salvia officinalis* L.), Camomila (*Matricaria chamomilla* L.), entre outras. Essas plantas têm apresentado ação

bactericida e bacteriostática sobre bactérias presentes no biofilme dental e indicadas nos casos de gengivite, abscessos orais, inflamação e aftas (OLIVEIRA *et al*., 2007; PEREIRA *et al*., 2006).

Iauk *et al.* (2003) demonstraram que a *Althaea offinalis*, popularmente conhecida como malva ou malvavísco, vem sendo testada quanto a atividade antibacteriana, apresentando resultados promissores contra as bactérias periodontopatogênicas. A Calêndula (*Calendula officinalis*) é uma espécie empregada na cicatrização de feridas com ação anti-inflamatória e antibacteriana, e, na odontologia, vem sendo testada no controle de crescimento de bactérias do biofilme dental e bactérias periodontopatogênicas (BUFFON *et al*., 2001).

Outro fitoterápico com ação antimicrobiana é o óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*), estudos demonstraram atividade antibacteriana de uma formulação em gel de óleo de copaíba frente aos microrganismos presentes na cavidade bucal (SIMÕES *et al*., 2016). Os óleos da copaíba, do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), e do cravo (*Dianthus caryophyllus*) podem ser usados em caso de odontalgias. O açaí (Eut*erpe oleracea*) produz um evidenciador (corante) do biofilme com eficiência de 90% superior a produtos comercializados tais como o verde de malaquita, a fucsina e a eritrosina (FRANCISCO, 2010).

Santos *et al*. (2009) comprovaram a utilização de plantas medicinais para afecções da cavidade oral, sendo a romã (*Punica granatum* L.) a mais utilizada por parte dos pacientes e profissionais corroborando com o estudo de Evangelista *et al*. (2013) que demonstraram a existência de comercialização de plantas medicinais para patologias orais, destacando-se as seguintes espécies: Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), Pedra ume cãa (*Aulomyrcia sphareocarpa*), Crajiru (*Arrabidae chica*), além da planta, conhecida popularmente como Sara tudo (*Justicia acuminatissima*). Entre os Cirurgiões-Dentistas e entre os pacientes, apenas 8% e 7,61%, respectivamente, utilizaram plantas medicinais para alterações patológicas orais. Os autores concluíram que as plantas medicinais comercializadas na cidade de Manaus são utilizadas de maneira empírica e que, apesar da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), novas políticas públicas de saúde devem inserir plantas medicinais e fitoterápicos de uso oral na rede pública de saúde na cidade de Manaus, assim como a inserção da fitoterapia como uma matéria obrigatória nos cursos de graduação, corroborando com o estudo transversal de Nascimento-Junior *et al.* (2015) onde os profissionais da área da saúde necessitam de capacitação e motivação para prescrição adequada e segura de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.

A odontologia perscruta agentes biocompatíveis para serem usados nos tecidos dentinários para os mais diversos fins medicamentosos, Bandeira *et al*. (2016) evidenciaram a

eficácia de uma emulsão de óleo de copaíba e uma suspensão do extrato de etanol de própolis como agentes de limpeza dentária.

Uma emulsão a base de óleo de *Copaifera multijuga* (copaíba) foi testada como biomodificador dentinário antes do uso de adesivo universal e autocondicionante evidenciando em seus resultados uma camada híbrida regular e homogênea na superfície dentinária em dentina afetada por cárie, com resultados superiores aos padrões já utilizados na prática clínica odontológica, independente do adesivo que foi utilizado durante o processor restaurador padrão testado. Esta emulsão apresentou estabilidade físico-química por 12 meses, demonstrando ainda atividade antibacteriana (bactericida e bacteriostática), inibição da atividade das metaloproteinases (MMP-2 e -9) expressas pelas células da linhagem HT1080, atividade anti-inflamatória, dentre outras atividades terapêuticas (ARAÚJO *et al*., 2020; ARAÚJO *et al*., 2021; BRASIL *et al*., 2022; LIMA *et al*., 2022; MEIRA *et al*., 2020; MOURA *et al*., 2021).

A partir dos testes realizados com esta emulsão, realizou-se um teste clínico randomizado em 27 dentes decíduos para avaliação da superfície dentinária através de Microscopia eletrônica de varredura, análise histológica e análise microscópica eletrônica de transmissão dos dentes esfoliados, onde o mesmo demonstrou melhor integridade da camada híbrida, e, associado aos testes de estabilidade e controle de qualidade apresentou segurança para uso na prática clínica (BRASIL, 2022).

Além deste fitoterápico promissor para fins odontológicos à base de copaíba, outras plantas, como a *Libidibia ferrea* L. vêm sendo testadas para outros fins farmacêuticos no intuito de agregar uma formulação inovadora para tratamento de afecções da cavidade bucal.

2.3.1 *Libidibia ferrea* L. (*Martius ex* Tul.)

A flora amazônica apresenta o maior patrimônio genético de plantas medicinais. Estudos etnobotânicos apontam diversas plantas utilizadas na odontologia presentes nesta região, além do nordeste brasileiro, Espírito Santo e Rio de Janeiro. Dentre as espécies podemos destacar a *Libidibia ferrea* L., ex *Caesalpinia ferrea* M., conhecida como jucaína, jucá pau-ferro-verdadeiro ou birá-obi, que é uma espécie da família Leguminosae, uma das maiores famílias dentre as dicotiledôneas com cerca de 650 gêneros e mais de 18 mil espécies (CAVALHEIRO *et al*., 2009; MARREIRO *et al*., 2014).

Sendo uma subfamília cujas espécies são tipicamente tropicais, está bem representada nos biomas brasileiros. Na Reserva Florestal Adolpho Ducke, por exemplo, localizada ao norte de Manaus (AM), são encontrados representantes de 16 gêneros das Caesalpinioideae e aproximadamente 53 espécies entre árvores, arbustos e lianas. Assim também, os diferentes

ecossistemas amazônicos, as leguminosas compõem importante parte da flora na paisagem das matas ribeirinhas, dos igapós, savanas, campinaranas, matas secundárias, cerrados e várzeas, predominando em mata primária de terra firme (LEWIS *et al*., 2005; SOUZA *et al*., 1997).

Muito utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas anti-inflamatória, analgésica, antimicrobiana e antitérmica, o pó da *Libidibia ferrea* L. é bastante utilizado pela população para o tratamento de feridas cutâneas. A utilização e comercialização de suas diversas partes, como a farinha da casca vem despertando o interesse de pesquisadores para estudos biotecnológicos (CAVALHEIRO *et al*., 2009; DROZINO *et al*., 2017; OLIVEIRA *et al*., 2013; PEREIRA *et al*., 2012; SAMPAIO *et al*., 2009). Além disso, pode ser utilizada para tratamento de feridas, contusões, combate a asma, tosse crônica, no combate de úlceras gástricas, atividades cardiotônicas, anti-histamínicas, antialérgicas e anticoagulantes, apresentando atividade antimicrobiana frente aos microrganismos presentes no biofilme dental (ALVES *et al*., 2009; CAVALHEIRO *et al*., 2009; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; DROZINO *et al*., 2017; MAIA, 2004).

Estudo preliminares sobre o perfil fitoquímico foram realizados a partir do extrato hidroetanólico das folhas e da casca do caule da *Libidibia ferrea* L. comprovando a presença de substâncias como flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e substâncias fenólicas (ALMEIDA *et al*., 2021; GONZÁLES; BARROS; BACCHI, 2004; KOBAYASHI *et al.*, 2015; SOUZA *et al*., 2015). Quanto ao perfil fitoquímico do extrato aquoso da vagem da *Libidibia ferrea* L. foram comprovados a presença de alcaloides, antraquinonas, açúcares, flavonoides, taninos, saponinas, sesquiterpenos, lactonas e triterpenos, apresentando dentre estes, maior concentração de taninos (ALMEIDA *et al*., 2021; SOUZA *et al*., 2015; MACEDO *et al.*, 2020). Destacam-se na avaliação dos constituintes químicos, os polifenóis, na sugestão de que o ácido gálico e o ácido elágico podem ser as possíveis substâncias responsáveis por parte da atividade biológica e terapêutica da vagem (ALMEIDA *et al*., 2021; UEDA *et al*., 2011).

Estudos já comprovaram a atividade antimicrobiana *in vitro* da *Libidibia ferrea* L. sobre microrganismos presentes no biofilme dental. Um enxaguatório bucal desenvolvido, seguindo as normatizações vigentes da ANVISA (segurança, eficácia e qualidade), a partir do extrato desta planta demonstrou resultados positivos frente ao controle do crescimento microbiano. A atividade antimivrobiana do enxaguatório fitoterápico à base do extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* L. a 1% foi avaliado frente a microrganismos como *Streptococcus mutans (*ATCC25175), *Streptococcus oralis* (ATCC10557), *Streptococcus salivarius* (ATCC7073), *Lactobacillus casei* (ATCC7469) e *Candida albicans* (DPUA 1706) determinando a

concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em caldo, assim como, realizou-se os testes de controle de qualidade avaliando a presença de contaminantes (*Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) bem como as características organolépticas do produto (cor, brilho, consistência e odor), pH, densidade e sedimentação (VENÂNCIO *et al*., 2015). Ainda realizando os testes pré-clínicos e farmacológicos do enxaguatório, avaliou-se a citotoxicidade através do teste de hemólise e cultura de células bem como o potencial erosivo através do teste de microdureza (dureza Knoop) e a capacidade de manchamento dentário. O enxaguatório de *L. ferrea* L. apresentou condições de estabilidade e qualidade sem contaminantes no produto, atividade bactericida e fungicida frente aos microrganismos do biofilme dental. Não foi citotóxico frente ao teste de hemólise e de cultura de células; não alterou a microdureza do esmalte dentário, porém causou alteração de cor após uso prolongado.

Soares *et al*. (2013) analisaram a atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* e *Aloe vera* (L.) Burn.f. em lesões cutâneas totais provocadas experimentalmente em ratos da linhagem 24 Wistar. Foram divididos em 3 grupos (A, B e C) com 5 animais cada, onde foram tratados com pomada de babosa a 10%, pau-ferro a 10% e uma pomada orabase não-iônica e realizadas análises histopatológicas nos ratos após o 5° dia de lesão induzida. Durante a análise histopatológica pode-se observar as diferenças de resultados entre os diferentes tratamentos, no grupo controle notou-se a presença de crosta fibrino leucocitária desprendida do epitélio, presença de neovasos e um acentuado infiltrado leucocitário. No grupo B observou-se a presença de crosta fibrino leucocitária desprendida do epitélio, presença de neovasos e discreto infiltrado inflamatório e, por fim, no grupo C (tratado com *Caesalpinia ferrea*) foi observado a grande quantidade de neovasos, presença de discreta crosta fibrino leucocitária e de infiltrado leucocitário. Com esta análise comprovou-se o poder cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* e *Aloe vera* (L.) Burn.f. com diferença significativa entre os grupos tratados e controle, predominando um melhor resultado do grupo tratado com *Caesalpinia ferrea*.

A avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico da vagem de *Libidibia ferrea* L. em dorso de ratos foi comprovada por Kobayashi *et al*. (2015). Após o preparo do extrato etanólico liofilizado (12,5% e 50%) foram realizadas as devidas análises fitoquímicas e testes de toxicidade oral onde os ratos receberam uma dose do extrato de 5g/kg por via oral e observados durante 14 dias. Para o teste *in vivo* 24 ratos da linha Wistar foram divididos em 4 grupos (G1, G2, G3 e G4) com 6 ratos cada, sendo o grupo G1 tratado com soro fisiológico, o G2 com digluconato de clorexidina a 1%, o G3 com extrato de *Libidibia ferrea* L. a 12,5% e, por fim, o G4 com extrato de *Libidibia ferrea* L. a 50%, que após a indução da

lesão foram tratados pela via tópica a cada 24 horas. Kobayashi *et al*. (2015) constataram que a concentração pode influenciar no resultado do tratamento, pois a concentração a 12,5% mostrou-se superior à de 50% que retardou o processo de contração da ferida e apresentou menor grau de reepitelização. O extrato, nas doses testadas não demonstrou toxicidade aguda o que representa uma boa segurança em ensaios farmacológicos para ratos.

Um estudo semelhante para avaliação da atividade cicatrizante da *Libidibia ferrea* L. foi realizado por Oliveira *et al*. (2010) em lesões cutâneas de caprinos onde após a indução das lesões as mesmas foram tratadas com uma pomada a base de *Libidibia ferrea* L. onde apresentou resultados extremamente significativos no processo de cicatrização das feridas.

Diante disso, Melo *et al.* (2022) planearam uma nova formulação fitoterápica a base de *L. ferrea* L. para tratamento de úlceras traumáticas bucais, onde testaram a atividade cicatricial em úlceras traumáticas bucais de ratos normossistêmicos machos da linhagem *Wistar*, evidenciando um resultado superior ao agente terapêutico empregado padrão para o tratamento desta afecção bucal, observou-se a redução de tempo de cicatrização e melhor reparação tecidual da formulação em orabase de *L. ferrea* L.

Lins *et al.* (2022) observaram em um estudo experimental *in vitro* onde o extrato de *L. ferrea* L. não demonstrou citotoxicidade no ensaio de MTT após 24 horas de tratamento, demonstrando ainda, a atividade anti-inflamatória do extrato, mostrando melhores resultados que a dexametasona, sugerindo a incorporação do extrato em uma formulação com atividade anti-inflamatória, inclusive dentro da odontologia, sem riscos tóxicos as células teciduais da cavidade bucal.

A formulação a base de *L. ferrea* L. vem sendo testada em teste *in vitro* e *in vivo* para tratamento de úlceras bucais em ratos normais e diabéticos. Melo *et al.* (2022) realizaram a caracterização físico-química e microbiológica de uma formulação a base de *L. ferrea* L. por 60 dias onde foi evidenciado a estabilidade físico-químico em todas os tempos e condições de armazenamento testados, propondo uma potencial inovação farmacêutica fitoterápica para a área odontológica.

2.4 Desenvolvimento tecnológico farmacêutico

O desenvolvimento de novas tecnologias farmacológicas traz novas opções de tratamento, bem como de formulações, aprimorando a efetividade terapêutica de medicamentos já existentes no mercado, igualmente incluindo novos princípios ativos, mais potentes e eficazes. Com o advento da era industrial os produtos isolados de plantas ou a partir dela

sintetizados vem ganhando mercado quanto a novas descobertas curativas/paliativas (BÔAS & GADELHA,2007; TOLEDO *et al*., 2003).

O setor farmacêutico foi deliberado como estratégico para o desenvolvimento econômico do país. Desde 2016, o Brasil ampliou internamente seus investimentos no ramo e as empresas tornaram-se fortes no mercado. O desenvolvimento de medicamentos demanda muito tempo (em média 20 a 25 anos) até chegar em sua fase final de inserção mercadológica, e, para que isto ocorra, as empresas buscam organizar-se com estratégias para reduzir a incerteza técnica e comercial do futuro produto inovador. Além da descoberta de novas moléculas, formulações, formas farmacêuticas, doses, entre outros, tornam-se obrigatórios os testes pré-clínicos e clínicos para comprovar a sua eficácia e segurança até a sua autorização do registro sanitário e, por fim, sua comercialização e farmacovigilância. Por isso, é muito importante a seleção de uma doença cuja a terapêutica emane o amplo consumo do medicamento, para que tenha o retorno do investimento durante todo o processo, sendo as doenças crônicas as mais rentáveis para o setor (BUENO, 2017; PINHEIRO, RAPINI & PARANHOS, 2021; RADAELLI, 2006; SINHA, VOHORA, 2018).

O Brasil representa um mercado significativo no desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos, com a região Norte representando cerca de 33% do registro de patentes dos mesmos. Há diversos fatores limitante para que o país desenvolva pesquisa com plantas medicinais em escala mais expressiva, dentre elas são destacadas a limitação política e legislativa, de parcerias pública-privada e entre as indústrias e universidades (CARVALHO *et al.*, 2008; PINHEIRO, RAPINI & PARANHOS, 2021).

A política deve enfatizar a difusão das tecnologias, agregando valores ao produto, assim como os processos locais de aprendizado, valorizando os sistemas produtivos locais. Outra dificuldade encontrada é a procedência sanitária do material vegetal, sendo esta irregular, sobretudo com a contaminação microbiológica, além da presença de herbicidas e agrotóxicos (MATTOS *et al*., 2018; PINHEIRO, RAPINI & PARANHOS, 2021).

Com o surgimento das indústrias farmacêuticas e descobertas de substâncias químicas sintetizadas industrialmente houve uma diminuição no interesse pelos fitoterápicos e plantas medicinais. Apesar disso observa-se até a presente atualidade que uma parcela populacional ainda apresenta dificuldade de acesso a certas classes medicamentosas industrializadas, com isso a indústria farmacêutica e as políticas nacionais de saúde pública buscam ampliar a oferta de serviços e produtos tecnológicos farmacêuticos relacionados à fitoterapia, de forma segura e racional, considerando o sujeito em sua singularidade e inserção sociocultural, promovendo a integralidade, principalmente na atenção básica à população (MATTOS *et al*., 2018). A

indústria de fitoterápicos e plantas medicinais representa uma excelente alternativa para a produção sustentável e com a possibilidade de ampliação de alternativas terapêuticas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) visando a melhora da atenção primaria à saúde e inclusão social (HASENCLEVER *et al*., 2017; MIRANDA & UHLMANN, 2021).

Os fitoterápicos, diferente dos medicamentos alopáticos, apresentam variações quanto à complexidade de sua composição e qualidade das drogas obtidas a partir de uma mesma espécie vegetal, intimamente relacionados às condições de plantio, processo de coleta, processamento e manuseio da matéria-prima vegetal - MPV (KLEIN *et al*., 2009).

Os produtos naturais têm sido a maior fonte de novos fármacos, até mesmo para alguns medicamentos quimicamente sintetizados resultantes da síntese de plantas medicinais para reprodução da atividade terapêutica destes ativos. O processo de validação leva à descoberta de novas ações farmacológicas de moléculas conhecidas e à descoberta de novas moléculas. O desenvolvimento de um novo fármaco normalmente fica restrito a indústrias multinacionais sediadas em poucos países desenvolvidos, requer grandes investimentos, tempo inestimável de pesquisa e alto risco de resultados não previstos. O desenvolvimento de um fitoterápico com comprovação de qualidade, segurança e eficácia demanda grandes recursos tecnológicos, contudo estimula o crescimento de diversos setores industriais, incluindo o setor primário, pois a cadeia produtiva de plantas medicinais é altamente agregadora de valor (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

A padronização do medicamento fitoterápico é um dos maiores desafios para o desenvolvimento de produtos oriundos de recursos naturais, pois existe a necessidade de garantir a cadeia produtiva adequada e a concentração do princípio ativo do material biológico para assegurar a efetividade e segurança do produto durante o seu consumo (DAVID *et al*., 2015; SKITYCZ *et al*., 2016).

Em janeiro de 2016 sancionou-se a Lei n° 13.243, que aprimora as medidas de incentivo à inovação e à pesquisa cientifica e tecnológica no ambiente produtivo para o alcance da autonomia tecnologia e desenvolvimento do sistema produtivo nacional e regional. O novo Marco Legal cria um ambiente mais favorável a pesquisa, desenvolvimento e inovação nas universidades, nos institutos públicos e nas empresas, principalmente para pequenas startups. As universidades desempenham um fator catalisador para o ecossistema do empreendedorismo e inovação no Brasil, inserindo empreendedores com capacidade intelectual, e, estimulando o investimento industrial em novas tecnologias farmacêuticas advindas dessas pesquisas. No mundo capitalista, a inovação e desenvolvimento de novos produtos é considerada a principal arma de competição, integrando o núcleo de estratégia empresarial. Pode-se observar dois

segmentos de mercado: um voltado para as substâncias isoladas e outro para a droga vegetal, contendo substâncias de ação sinérgica. O desenvolvimento do Acheflan® (Laboratório Aché), produzido a partir da planta *Cordia verbenacea*, é um exemplo de fitomedicamento totalmente desenvolvido no Brasil. O produto tornou-se o mais prescrito pelos médicos, representando cerca de 44% das prescrições médicas (BARATA-SILVA *et al*., 2017; CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008). Além deste, pode-se destacar o ácido acetilsalicílico, identificado no extrato vegetal da *Salix alva*, a *Aloe vera*, conhecida por diversas propriedades terapêuticas dentre elas purgativas, revulsivante, imunorreguladora, entre outras (BARATA-SILVA *et al*., 2017; CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

Os produtos farmacêuticos podem apresentar limitações na prática clínica devido à sua baixa solubilidade, baixa estabilidade e baixo efeito de direcionamento. Por isso, muitas formas novas de dosagem e sistemas de administração de fármacos são desenvolvidas para melhorar a eficiência clínica dos fármacos, reduzir a sua toxicidade e melhorar a adesão do paciente. A tendência de cada geração mercadológica é trazer sistemas de liberação de ativos cada vez mais inteligentes. Desde a década de 1990, os sistemas de liberação de fármacos nanoparticulados atraíram atenção generalizada nas pesquisas farmacêuticas (PESSANHA *et al.*, 2012).

Os nanoparticulados apresentam propriedades especificas de entregar o fármaco eficientemente no local de ação, independente da via de administração, assim como a eficácia terapêutica pode ser otimizada e os seus efeitos colaterais reduzidos. Dentre as nanopartículas mais utilizadas podemos citar o óxido de ferro, ouro, poliméricas, lipossomos, micelas, fulenos, nanotubos de carbono, grafeno, dendrímeros, nano diamantes, entre outros. As nanopartículas poliméricas apresentam excelente biocompatiblidade e biodegradabilidade, além de serem não tóxicas e não imunogênicas. As mesmas são intensivamente estudadas para carreamento e a liberação de diversos fármacos anticancerígenas, como o Abraxane® utilizado para veiculação de quimioterápicos para o tratamento de diversos tipos de cânceres. Os carreadores anfofílicos também possuem propriedades biológicas de isolamento do princípio ativo do meio circundante, evitando sua degradação, bem como a capacidade de carrear fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos (ALLEN; CURRIS, 2004; VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Outra proficuidade dos fármacos nanoparticulados é que eles não são capazes de atravessar tecidos sadios, somente tecidos inflamados ou acometidos por tumores, efeito conhecido como Enhanced Permeability and Retection (EPR), além disso, a superfície pode ser alterada para direcionar o nanocarreador para o tecido/célula alvo, alterando sua farmacocinética (ALLEN; CURRIS, 2004; KHAWAR; KIM; KUM, 2015). A administração de fármacos via bucal tem algumas vantagens bem conhecidas sobre a distribuição de fármacos,

pois como a mucosa oral por ser bem permeável e suprida de vasos sanguíneos, os fármacos são prontamente absorvidos através de transportes transcelulares. Além disso, a via contorna ambientes gástricos e intestinais e apresentam vantagens clínicas como maior biodisponibilidade, menor variação interindividual e maior segurança. Em particular, a administração oromucosa aparece como uma opção promissora para substâncias quimicamente instáveis e sensíveis, além da boa adesão da terapia pelo paciente (MONTANHA & AZEVEDO, 2013).

Dentre as inovações tecnológicas farmacêuticas podemos citar medicamentos com formas farmacêuticas semissólidas. As formulações semissólidas de uso tópico são aquelas que se destinam a aplicação a pele e mucosas, do ponto de vista farmacotécnico, as mais utilizadas podem ser classificadas como: pomadas, cremes, géis, pastas e emplastros. Sobre o enfoque físico-químico, as preparações semissólidas podem ser classificadas como organogéis, hidrogéis e cremes; quanto à solubilidade, em lipofílicas (gordurosas) de fase única como as bases hidrofóbicas, as bases de absorção e os lipogéis ou lipofílicas bifásicas, como emulsão água/óleo; e em hidrofílicas (miscíveis com água) de fase única como o macrogols e os hidrogéis e hidrofílicas bifásicas como emulsões óleo/água (BORELLA *et al.*, 2010; BRASIL, 2022; SIEBEN, 2012).

Podem ser ainda classificadas, conforme o sistema de liberação dérmica, em curativos oclusivos, adesivos transdérmicos oclusivos, materiais lipofílicos, base de absorção, bases emulsificantes, emulsões água/óleo, emulsões óleo/água, umectantes e pós. Diversas matérias-primas estão disponíveis para a preparação destas formas farmacêuticas, os mais utilizados são: glicerídeos, ceras, hidrocarbonetos, bentonita, silício, alginatos, meticelulose e carboximetilcelulose, pectina, maltodextrina, amido, entre outros, a escolha adequada irá depender de diversos fatores, incluindo o principio ativo a ser utilizado e os outros componentes da formulação (BRASIL, 2022).

As pomadas são formas farmacêuticas constituídas por hidrocarbonetos líquidos em uma matriz de hidrocarbonetos sólidos de elevado ponto de fusão. A pomada deve possuir o efeito oclusivo e ação endodérmica com penetração cutânea para alcançar seus fins terapêuticos, sem atingir a corrente sanguínea sistêmica, utiliza-se em associação os excipientes vaselina sólida/líquida e/ou lanolina (BORELLA *et al*., 2010; SIEBEN, 2012).

A bioadesão ocorre quando a pele ou mucosa e uma molécula (natural ou sintética) são unidas por um período de tempo através de forças químicas ou físicas. Quando a região de aplicação tópica é a mucosa, chama-se mucoadesão, este mecanismo é caracterizado pela ligação da substância, veículo de transporte do fármaco, a um substrato biológico (superfície

da mucosa) (BRUSCHI & FREITAS, 2005; CARVALHO *et al*., 2014; ROSSI *et* al., 2005; SANGEETHA *et al.*, 2010).

A mucoadesão tem sido amplamente empregada no desenvolvimento tecnológico farmacêutico em formas de doses poliméricas para administração em mucosas vaginal, ocular, nasal e bucal. Os polímeros aplicados possuem excelentes propriedades mucoadesivas, com grupo carregados e/ou grupos funcionais não-iônicos aptos para formarem ligações de hidrogênio com a superfície tecidual, fornecendo maior tempo de aderência e a depender do veículo a ser incorporado na formulação, uma proteção na área aplicada. A seleção do polímero adesivo carreador do fármaco é fundamental para as propriedades de biocompatibilidade e bioadesão (BRUSCHI & FREITAS, 2005; CARVALHO *et al*., 2014; ROSSI *et* al., 2005; SANGEETHA *et al.*, 2010).

A mucosa bucal possui em torno de 30 cm^2, composta de três diferentes camadas: epitélio, membrana basal e tecido conjuntivo. A espessura do epitélio bucal está na faixa de 500 a 800μm com 40 a 50 células de espessura, com tempo de renovação celular entre 5 a 6 dias. A mucosa da bochecha, lábios, mucosa alveolar, face inferior da língua, assoalho da boca e palato mole compõem a mucosa de revestimento que possui epitélio não queratinizado, enquanto a mucosa mastigatória e especializada (gengiva inserida, palato duro e dorso da língua) possui epitélio para e ortoqueratinizado (BATH-BALOGH; FEHRENBACH, 2011).

O processo de mucoadesão ainda não está totalmente esclarecido, contudo, sabe-se que duas etapas são necessárias para que ocorram: o estágio de contato e o estágio de consolidação. No primeiro, há o contato da formulação mucoadesiva com o tecido promovendo o espalhamento e intumescimento da formulação. No segundo estágio, ocorre a interpenetração química e mecânica das cadeias da formulação com a das macromoléculas da superfície tecidual, o que resulta no aumento de área de contato gerando adesividade (GUSMÃO, 2018).

Pode-se destacar quatro teorias que tentam explicar às diversificadas interações que constituem, essas ligações mucoadesivas: teoria do molhamento, eletrostática, difusão e adsorção (EDSMAN; HAGERSTROM, 2005).

Devido à facilidade de acesso as mucosas bucal e sublingual, a sua aplicação é frequentemente indolor, tem baixa indução de infecção e há liberação direto no tecido, oferecendo uma alternativa promissora para superar as limitações das vias orais e parenteral. As preparações mucoadesivas proporcionam um contato prolongado no tecido alvo, rápida absorção e efeito farmacológico, baixa atividade enzimática, redução da dose requerida e menos efeitos adversos (BRUSCHI & FREITAS, 2005; ROSSI *et* al., 2005; SANGEETHA *et al.*, 2010).

A biodisponibilidade de um princípio ativo pode ser alcançada após sua administração sob pele e mucosas em forma de géis ou pomadas. A administração tópica de formulações semissólidas oferece ainda como vantagens sobre a liberação do fármaco: evita dificuldades de absorção gastrintestinal do fármaco, substitui a administração oral quando esta via é inadequada, evita o efeito de primeira passagem hepática, evita o metabolismo e absorção variáveis à administração oral e permite administração rápida e fácil do medicamento (BRUSCHI & FREITAS, 2005; ROSSI *et* al., 2005; SANGEETHA *et al.*, 2010).

Por fim, cada produto inovador deve seguir um processo adequado para garantir a segurança e eficácia antes de sua comercialização. Berkowitz (2006), Guido *et al.* (2010) e Bueno (2017) descreveram simplificadamente o processo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos, como estudos in vitro, in vivo, caracterização dos efeitos biológicos em animais (testes pré-clínicos), antes de serem iniciados os estudos em seres humanos.

2.5 Controle de qualidade dos produtos fitoterápicos

A normatização dos produtos fitoterápicos e naturais está vigente para garantir o seu uso seguro e eficaz. O controle de qualidade das drogas vegetais e seus produtos deve incluir antes dos testes laboratoriais e clínicos a identificação macroscópica e microscópica, bem como a análise do perfil cromatográfico, critério este importante para aplicar-se as "Boas Práticas de Fabricação" determinando produtos de qualidade e resultados mais conclusivos (BRASIL, 2022; BRASIL, 2010; BRASIL, 2013; CALIXTO, 2000; COSTA; GUIMARAES; VIEIRA, 2014).

O controle de qualidade de medicamentos/produtos fitoterápicos é primordial para assegurar a eficácia e segurança do mesmo e compreende uma série de análises da sua matéria-prima e da formulação finalizada, como ensaios farmacológicos não-clínicos (análises físico-químicas e microbiológicas) e clínicos dos efeitos biológicos recomendados, bem como seus efeitos tóxicos. Embora diversos estudos tenham demonstrado a necessidade de garantir segurança a cada produto de origem vegetal (BRASIL, 2013; CALIXTO, 2000; ISAAC *et al*., 2008; SIMÕES *et al*., 2007; ZHANG *et al*., 2012).

Os parâmetros de qualidade são estabelecidos nas Farmacopéias e Códigos oficiais, nesse sentido existem monografias definindo o critério de pureza, identidade e de teor, dentre elas: a Farmacopéia Brasileira, Européia, Alemã, Americana, a elaborada pela OMS (Organização Mundial de Saúde), entre outras (BRASIL, 2022; SIMÕES *et al*., 2007).

Os parâmetros do controle de qualidade variam de acordo com o tipo de matéria-prima vegetal e sua procedência e é responsável pelas atividades referentes à:

I - A amostragem;

II - As especificações;

III - Aos ensaios; e

IV - A organização, documentação e procedimentos de liberação; RDC 13/2013 (BRASIL, 2013).

Segundo a Resolução RDC 89/2004 (BRASIL, 2004), a ANVISA publicou uma lista de fitoterápicos de registro simplificado e buscou estabelecer a padronização de marcadores químicos para diversas plantas e limite diário para seu uso. Buscando atuar neste contexto, a necessidade de determinar o teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais, a qualidade do produto manipulado é conduzida através das Boas Práticas de Manipulação Farmacêutica (BPMF) segundo RDC n°67 de 2007 (BRASIL, 2007), onde o controle de qualidade é ferramenta indispensável para sua verificação, para atingir um produto com qualidade farmacopeica e que possa ser manipulado quantas vezes for necessário, com os mesmos parâmetros de qualidade.

Chechinel-Filho (1998) propôs algumas etapas experimentais para obtenção de princípios ativos de plantas. Segundo o autor, somente a maior concentração são isolados e estudados, o que exclui as substâncias em menores proporções que apresentam melhores efeitos biológicos, portanto, necessita-se de metodologias para obtenção de extratos onde obtêm-se substâncias puras, onde a certeza da atividade biológica pertence ao princípio ativo específico.

Segundo a RDC 17/2010 (BRASIL, 2010), as especificações devem incluir, ao menos, as seguintes informações:

a) testes para determinação de contaminação microbiológica;

b) uniformidade de peso, tempo de desintegração, dureza e friabilidade, viscosidade, consistência e tempo de dissolução, quando aplicável;

c) aparência física tais como, cor, odor, forma, tamanho e textura; perda por secagem ou conteúdo de água;

d) testes de identificação, determinação qualitativa de substâncias relevantes das plantas (por exemplo, cromatogramas fingerprint);

e) quantificação dos marcadores, e métodos analíticos disponíveis;

f) testes limite para solventes residuais.

Os testes de controle de qualidade e especificações para medicamentos fitoterápicos devem contemplar a determinação qualitativa e quantitativa dos principais componentes ativos (BRASIL, 2022; BRASIL, 2010a).

A avaliação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos pela RDC 13/2013 deve abranger todos os fatores relevantes, incluindo: as condições de produção, os resultados de controle em processo, a documentação de fabricação, incluindo a embalagem, o cumprimento das especificações para o produto acabado e a análise da embalagem final (BRASIL, 2013).

O controle de qualidade deve abranger, como dito anteriormente, metodologias para a análise dos seus constituintes vegetais. Segundo literatura a metodologia mais adequada para esta análise é a obtenção de um extrato hidroalcoólico (50% água/50% etanol – v/v). Existem diversos procedimentos relatados em literatura, outro exemplo é a semi-purificação de extratos, onde filtra-se os extratos alcoólicos brutos em sílica gel com solventes de polaridades crescentes, separando-os pela polaridade (BRASIL, 2022; CHECHINEL-FILHO, 1998; SIMÕES *et al.,* 2007). Independente da metodologia utilizada para obtenção dos compostos ativos, posteriormente, os extratos devem ser avaliados biologicamente e submetidos aos métodos cromatográficos (BRASIL, 2022; CHECHINEL-FILHO, 1998; ISAAC *et al*., 2008; SIMÕES *et al.,* 2007).

Os produtos fitoterápicos são mais favoráveis à contaminação microbiana, portanto a segurança e controle de qualidade microbiológica. O controle de contaminantes é regulada através da Resolução n°67 de 2007, esta avaliação torna-se necessária para determinar a carga microbiana aceitável e verificar os microrganismos que podem apresentar potencial risco a saúde, por isso, na mesma, estipula-se os limites de contaminação microbiológica, sendo 100 UFC/mL para fungos e 300UFC/mL para bactérias (BRASIL, 2022; BRASIL 2007; PINTO *et al.*, 2003)

Alguns modelos experimentais foram propostos para avaliação da atividade biológica como: avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana pelos métodos de difusão em ágar e pelo método da concentração inibitória mínima, respectivamente (BAUER *et al.,* 1966; MITSCHER *et al*., 1972).

A avaliação da atividade analgésica pelos modelos de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos (COLLIER *et al*., 1968), modelo de dor induzida pela formalina em camundongos (HUNSKAAR *et al.,* 1985) e modelo de placa quente (EDDY & LEIMBACH, 1953); modelo de pleurisia induzida por neurotransmissores (HENRIQUES *et al.*, 1992); avaliação da atividade antiespasmódica através da contração de órgão isolado induzida por neurotransmissores (SCHLEMPER *et al*., 1996); e, por fim, avaliação da atividade antitumoral pelo modelo da leucemia "*in vivo*" (MUKHERJEE *et al*., 1993).

A estabilidade de produtos farmacêutico depende de fatores ambientais como temperatura, luz, umidade, assim como de fatores relacionados a própria composição do

produto como propriedades físicas e químicas dos princípios ativos e excipientes, forma farmacêutica e o que a constitui, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem, visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas (ANVISA, 2003; BRASIL, 2005; BRASIL 2022).

Segundo o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade (BRASIL, 2005) todo produto farmacêutico em desenvolvimento deve ser submetido a testes de estabilidade os quais apresentam frequências de estudo específicas: o estudo acelerado, o estudo de longa duração e estudo de acompanhamento. O estudo de estabilidade acelerado é designado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas em condições de armazenamento forçadas, este é realizado acondicionando amostras do produto em desenvolvimento em sua embalagem primária e submetendo-se, durante seis meses, a condições de 40º C e umidade relativa que pode ser de 75% no caso de embalagem primária de material semi-permeável, no caso de embalagem de material impermeável é isento o controle de umidade. O estudo acelerado é realizado em três análises (0, 3 e 6 meses) para doseamento, quantificação de produtos de degradação, dissolução (quando aplicável) e pH (quando aplicável). Outras análises, tais como esterilidade e pirogênio, dureza, podem ser realizadas apenas no primeiro e no último mês do estudo acelerado (BRASIL, 2012).

O estudo de estabilidade de longa duração é utilizado para estabelecer ou confirmar o prazo de validade e recomendar condições de armazenamento. Este estudo verifica as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas durante e, opcionalmente, após o prazo de validade, este é realizado submetendo-se as amostras do medicamento a 30ºC e umidade relativa conforme a do estudo acelerado, durante o número de meses que se deseja atribuir como prazo de validade. O estudo de longa duração é realizado em 7 análises (0, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses), realizando os mesmos testes do estudo acelerado. Como obrigatoriamente este estudo deve ser apresentado para a ANVISA após 24 meses de estudo, estas análises devem ser realizadas no momento zero e no 24º mês. O estudo de acompanhamento é realizado a cada 12 meses, devendo ser realizados todos os testes de um relatório de estudo de estabilidade. Este estudo tem por objetivo verificar se as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas mantiveram-se, conforme o estudo de longa duração (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012; BRASIL, 2022).

Conforme os dados obtidos pelo estudo de estabilidade acelerada e dados preliminares do estudo de longa duração e de acompanhamento, é possível avaliar o impacto que os efeitos químicos e físicos causarão em um produto farmacêutico quanto este é exposto a condições fora das estabelecidas pela rotulagem por curto período de tempo, determinando assim as

adequadas condições de armazenamento do produto final bem como suas devidas orientações no rótulo do produto e tempo de validade (BRASIL, 2005; BRASIL, 2012; BRASIL, 2022).

Estudos "*in vitro"* com um enxaguante bucal à base do extrato de *Libidibia ferrea* L. foram realizados por Venâncio et al. (2015), seguindo os testes padrões estabelecidos pelas normativas brasileiras, onde apresentou condições de estabilidade e qualidade farmacológicas, com ausência de contaminantes e sem alterações físico-químicas, demonstrando resultados promissores para estudos posteriores.

Ao avaliar através de estudos físico-químicos uma formulação em emulsão orabase à base de *Libidibia ferrea* L., os resultados demonstraram que a formulação testada apresentou uma instabilidade físico-química e presença de contaminantes após 60 dias de armazenamento, sendo a melhor estabilidade demonstrada em temperatura ambiente ao abrigo de luz (MATOS, 2016).

Entretanto, para garantir o controle de qualidade de uma formulação em orabase à base de *Libidibia ferrea* L., Melo (2018) realizou estudos físico-químico (centrifugação, pH, densidade, comportamento reológico) e controle microbiológico, além da avalição dos caracteres organolépticos. Os resultados demonstraram uma adequada caracterização físico-química por um período de 60 dias, sem alterações ou contaminantes microbiológicos durante todo tempo e condições de armazenamento, evidenciando uma formulação promissora para testes futuros.

Os produtos odontológicos que contém substâncias naturais apresentam boas perspectivas no mercado, devido à aceitação popular da fitoterapia, porém só devem ser introduzidos após a comprovação científica de sua eficácia e segurança, por meio de estudos laboratoriais e clínicos específicos (BRASIL 2007; BRASIL, 2013; BRASIL 2022; CALIXTO, 2000; ISAAC *et al*., 2008; WHO, 2005).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar testes de controle de qualidade físico-químico e avaliar a atividade cicatrizante em úlceras orais sob terapia tópica com pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. em ratos portadores de *diabetes mellitus*.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química qualitativa através do controle analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) do extrato de *Libidibia ferrea* L.;
- Avaliar a estabilidade da forma farmacêutica em orabase de uma formulação terapêutica fitoterápica a base de *Libidibia ferrea* L. em tempos e condições de armazenamento pré-estabelecidos;
- Avaliar as propriedades físico-químicas de controle de qualidade de uma formulação terapêutica fitoterápica a base de *Libidibia ferrea* L. em tempos e condições de armazenamento pré-estabelecidos;
- Verificar a presença de contaminantes bacterianos e/ou fúngicos de uma formulação terapêutica fitoterápica a base de *Libidibia ferrea* L. em tempos e condições de armazenamento pré-estabelecidos;
- Avaliar a eficácia na cicatrização de úlceras traumáticas induzidas sob a terapia tópica de acetonida de triancinolona e com pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. em mucosa bucal de ratos normossistêmicos e portadores de DM da linha wistar;
- Comparar a colagênese de fibroblastos das lesões em mucosa bucal de ratos normossistêmicos e portadores de DM da linha wistar;
- Caracterizar os parâmetros histológicos da cicatrização das úlceras traumáticas orais sob terapia tópica de acetonida de triancinolona em orabase e com pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. em mucosa bucal de ratos normossistêmicos e portadores de DM da linha wistar;
- Caracterizar a expressão de Fator de TNF-α, IL-1, TGF-β e CD-31 em úlceras traumáticas orais sob terapia tópica de acetonida de triancinolona em orabase e com pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. em mucosa bucal de ratos normossistêmicos e portadores de DM da linha Wistar.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa teve caráter quantitativo e qualitativo, descritiva, experimental, dividida em dois estudos (Figura 2): o primeiro, um estudo analítico "in vitro" controlado, e, o segundo, um estudo "in vivo" em um modelo experimental de úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos portadores de DM, seguindo a metodologia proposta por Cavalcante *et al*. (2011) e Seidel *et al*. (2003).

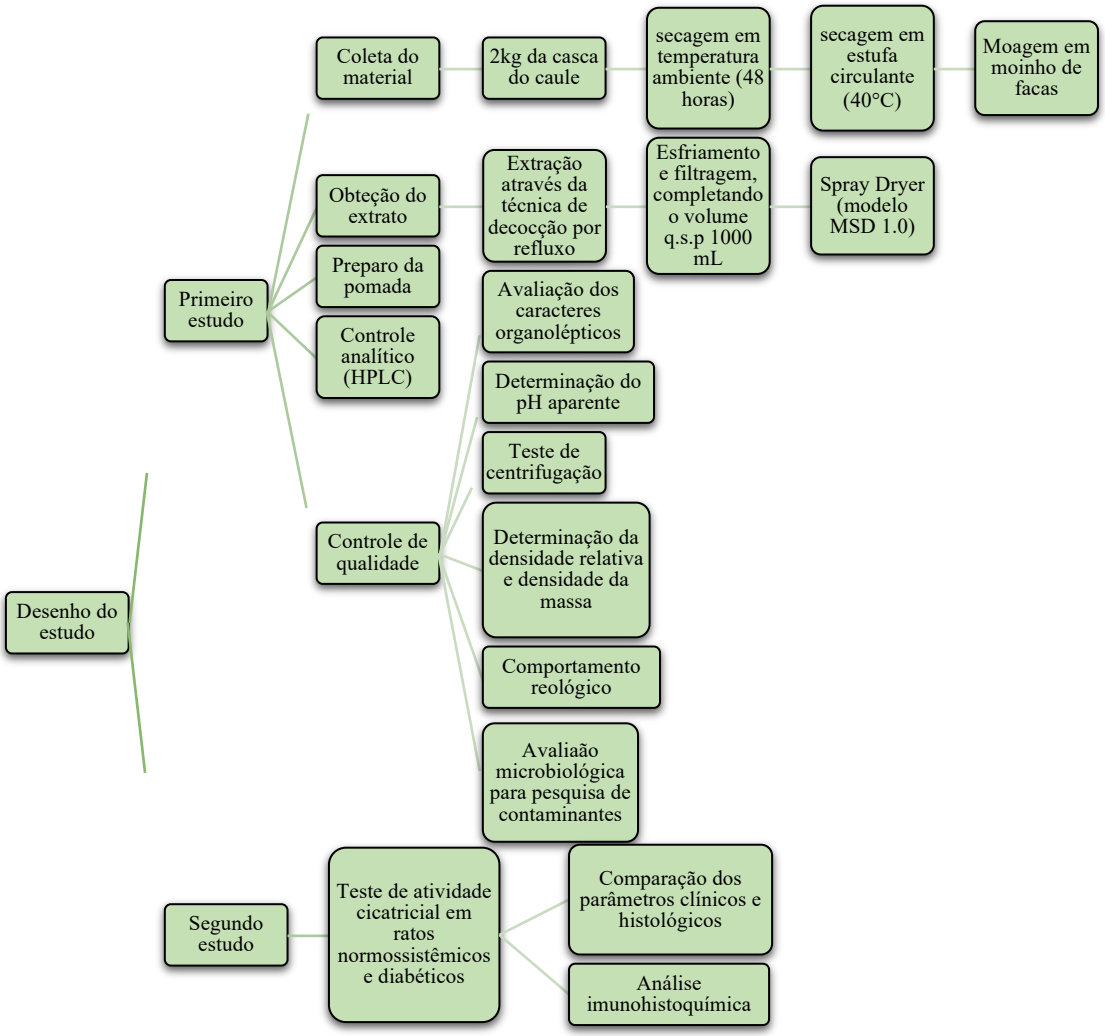


Figura 2. Fluxograma dos estudos "*in vivo*" e "*in vitro*".

4.1 Local da pesquisa e considerações éticas

Este estudo foi conduzido pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM) em parceria com a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO/UFAM) – Laboratório de

Atividade Biológica em Fitoterápicos em Odontologia (LABFITO) e com a Faculdade Federal do Ceará (UFC). O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA - UFC) sob o número de protocolo 3626280720, com o status de aprovado (Anexo A).

4.2 Coleta do material vegetal e preparo do extrato

Para este estudo foi utilizado a casca do caule da *Libidibia ferrea* L. (Figura 3), coletadas em material suficiente para o desenvolvimento do estudo da mesma árvore (aproximadamente 2kg). O processo de coleta foi supervisionado por um etnobotânico e realizado na área do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), no qual a amostra está registrada sob o número 228.022. As mesmas foram transportadas para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e processadas seguindo a metodologia baseada em Venâncio *et al*. (2015).

A casca do caule de *Libidibia ferrea* L. foi selecionada a fim de eliminar a sazonalidade da vagem. A casca do caule foi colocada para secar à temperatura ambiente por 48 horas, à sombra, em lugar seco e arejado (Figura 4). Ato contínuo, foi submetida à secagem em estufa de ar circulante (Figura 5), à temperatura de 40°C, até estabilização da umidade residual. Após a secagem, a porção vegetal foi submetida à moagem em moinho de facas (Figura 6), a fim de obter a matéria-prima vegetal (MPV - Figura 7).

Figura 3. Árvore de *Libidibia ferrea* L.

Figura 4. Casca do caule de *L. ferrea* L. secas.

Figura 5. Estufa de ar circulante.

Figura 6. Moinho de facas.

Figura 7. Matéria-prima vegetal.

O extrato foi obtido através da técnica de decocção por refluxo com uma relação droga:solvente (Figura 8) de 7,5% (m/v) utilizando água destilada e etanol (Figura 9) como líquido extrator, proporção de 1:1, ambos em uma quantidade de 500 mL. Misturou-se o solvente com a água e o etanol em um balão volumétrico de 2.000 mL e o mesmo foi levado ao equipamento aquecedor – Manta Aquecedora, decoctor sob refluxo (Figura 10).

O material extraído foi retirado, esfriado e filtrado em um balão volumétrico de 1.000mL e o volume foi completado com água destilada até alcançar 1.000mL (Figura 11a e 11b). A solução extrativa de jucá foi levada para o aparelho Spray Dryer (LabMaq- modelo MSD 1.0) para que fosse obtido o extrato seco por aspersão, visando reduzir o pó e manter a sua estabilidade (Figura 12 e 13).

Figura 8. Pesagem do extrato bruto.

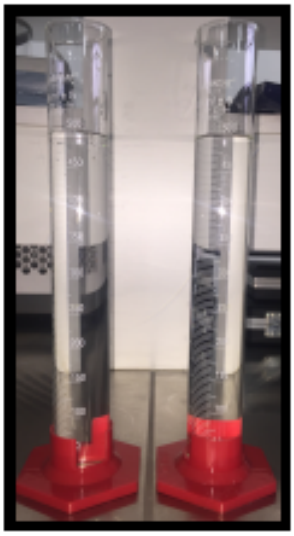


Figura 9. Água/etanol.

Figura 10. Decoctor.

Figura 11a e 11b. Filtragem.

Figura 12. Aparelho Spray dryer.

Figura 13. Extrato seco.

4.3 Rendimento do extrato de libidibia ferrea L. a 7,5%

O extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* L. a 7,5% após secagem por aspersão obteve um peso total de aproximadamente 114g (114,9436g). O rendimento total do extrato seco foi de 5,7%, conforme formula abaixo. Armazenou-se o extrato de Jucá em três recipientes, esterilizados, bem lacrados e em temperatura ambiente, ao abrigo de luz (Figura 14).

Re = (Peso do extrato seco/Peso das folhas secas) x 100

Re = (114,943/2000) x 100

Re = 0,057 x 100

Re = 5,7%.

Figura 14. Armazenamento do rendimento do extrato seco a 7,5%.

4.4 Preparo da pomada orabase

A concentração do extrato hidroalcoólico a 7,5% baseou-se no resultado da concentração inibitória mínima (37,5mg/mL) determinado na fase inicial dos estudos do jucá (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A pomada, obedecendo aos princípios conceituais da fitoterapia, teve como princípio ativo o extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* L. a 7,5%, em uma formulação de pomada orabase, cuja concentração (2%) foi determinada e testada em estudos anteriores (MELO *et al*., 2022).

A composição da formulação apresenta apenas uma fase oleosa (Figura 15a e 15b), com os seguintes componentes: vaselina sólida (80%), óleo mineral (17%), carboximetilcelulose (0,5%), propilparabeno (0,15%) e extrato seco de *Libidibia ferrea* L. (2%). Todos os compostos foram levados ao equipamento de Banho Maria (SL 155/10, Solab®) para o aquecimento até 75°C utilizando termômetro de mercúrio para aferição. Após a manipulação da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L., realizou-se, também, o preparo da orabase sem o jucá para que fosse realizado o teste do modelo em ratos (Figura 16a, 16b e 16c).

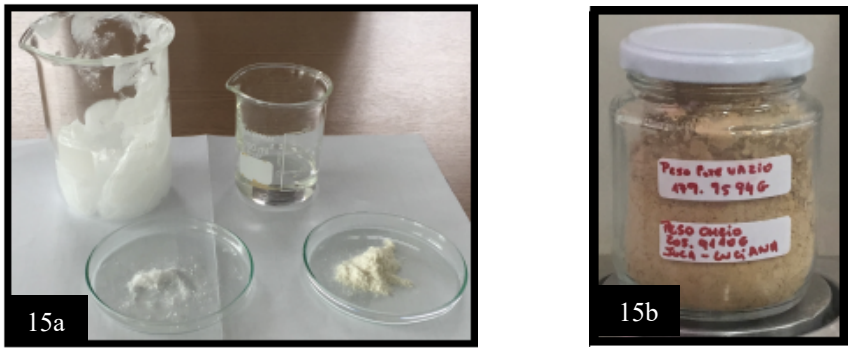


Figura 15a e 15b. Componentes da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. a 2%.

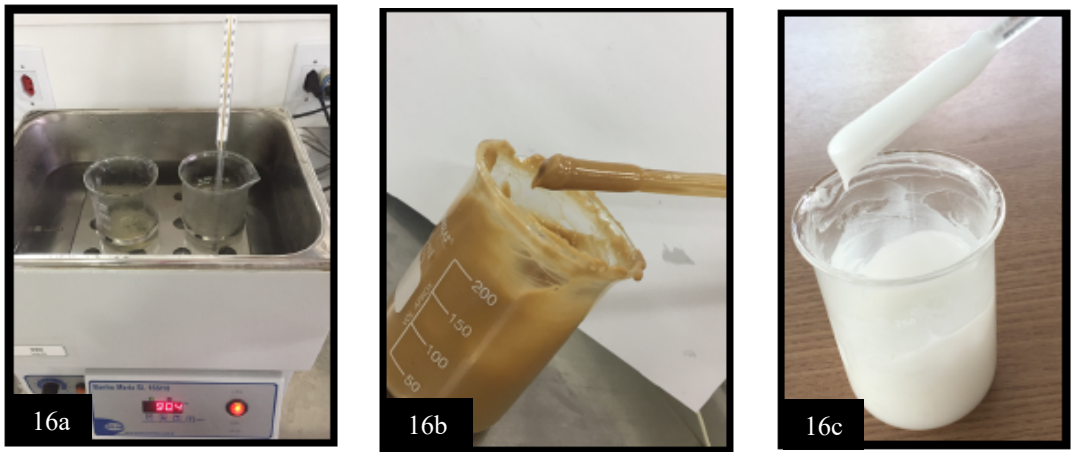


Figura 16a, 16b e 16c. Aquecimento me banho-maria, pomada orabase *L. ferrea* L. a 7,5 e Pomada orabase.

A pomada foi armazenada em locais com diferentes temperaturas e em diferentes períodos, conforme a padronização descrita na Farmacopeia Brasileira (2022). Os locais escolhidos para o teste foram: estufa (60 ±2 °C), temperatura ambiente claro (TAC) (±30-33 °C), temperatura ambiente ao abrigo da luz – escuro (TAE) (±26-30 °C), local com ar-condicionado (±24-26 °C), geladeira (±2-8 °C) e os períodos pré-estabelecidos experimentais: 0, 1, 2, 3, 6 e 12 meses. A pomada foi preparada na quantidade de 1,2 kg onde foram divididos em potes de vidros e distribuídos igualmente entre os grupos experimentais (BRASIL, 2007; BRASIL, 2013; BRASIL, 2022; CARVALHO *et al*., 2014; CARVALHO *et al*., 2018).

4.5 Quantificação das substâncias majoritárias do extrato de *Libidibia ferrea* L. a 7,5%.

Submeteu-se a quantificação das substâncias majoritárias do extrato de *L. ferrea* L. a 7,5%, através da solubilização em metanol a 1 mg mL^{-1} e submetido à análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no sistema HPLC Accela (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). A separação ocorreu na Coluna Luna C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm d.i.) (Phenomenex, Torrance, CA, EUA), com volume de injeção de 10 µL. A fase móvel foi composta por uma solução de ácido fórmico a 1% (A) e metanol (B) com taxa de fluxo de 1 mL min^{-1}. A eluição se deu em modo gradiente iniciando com variação de 20% a 80% (B) em 14 min, prosseguindo em modo isocrático a 80% de (B) por 10 min. O cromatógrafo foi equipado com os detectores arranjo de diodo (DAD) onde foram obtidos espectros na faixa do ultravioleta de 200 nm a 400 nm, e o detector de espectrômetro de massa triplo quadrupolo modelo TSQ Quatum Access (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), utilizando uma interface com ionização química a pressão atmosférica (APCI) no modo negativo e com a fragmentação de íons. A presença do ácido gálico foi definida por meio da comparação com o tempo de retenção do padrão e com íons observados no espectro de massas e os demais picos observados no cromatograma identificados através da comparação com a base de dados científicas.

4.6 Caracterização da pomada

Baseada nas normatizações padronizadas pela ANVISA (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2011) e pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2022) foram realizadas as análises físico-químicas referentes ao controle de qualidade seguindo os protocolos pré-estabelecidos descritos posteriormente, e, todos os testes foram realizados em triplicatas.

4.7 Testes físico-químicos de controle de qualidade

4.7.1 Teste de centrifugação

Para a verificação de possível separação de fases foram utilizados 5g da pomada de *Libidibia ferrea* L. em orabase acondicionada em tubos do tipo Falcon® e, posteriormente, centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos (Figura 17), à temperatura ambiente, para observação a olho nu de uma possível separação de fases, registrando SIM (em caso positivo) ou NÃO (em caso negativo).

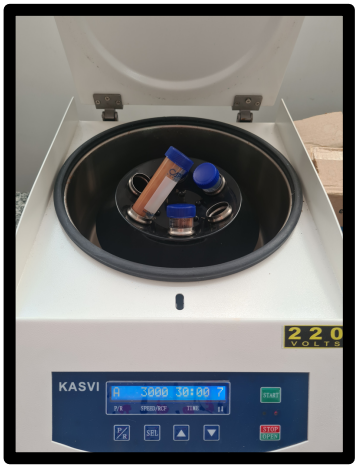


Figura 17. Centrifugação das pomadas.

4.7.2 Teste de pH

Aferiu-se o pH através do potenciômetro (Hanna Easy-Use Basic Meter – PH21-02), onde a calibração do aparelho foi realizada com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0, as quais possibilitam que haja uma linearidade nas respostas em relação às alterações de potencial observadas (Figura 18). Os resultados corresponderam à média das leituras, em triplicata, de cada amostra.

Figura 18. Aferição do pH da pomada.

4.7.3 Teste de densidade

As amostras, em triplicatas, foram transferidas para o picnômetro esteja limpo, seco e previamente calibrado. Logo após as transferências, realizou-se o ajuste da temperatura (20ºC) e quando necessário remoção do excesso do produto e pesagem (Figura 19a, 19b e 19c). O peso das amostras foi determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calculando a densidade relativa através da fórmula: *p(amostra) = d(água) x d(amostra) + 0,0012*.

Figura 19a, 19b e 19c. Picnômetro vazio, picnômetro com água e picnômetro cheio – padronização do teste de densidade nos tempos e condições pré-estabelecidos.

4.7.4 Teste reológico

As características reológicas foram avaliadas com o auxílio do viscosímetro rotacional digital de Brookfield DV-II + pro, utilizando o spindle LV-4 (Figura 20). As análises foram baseadas no protocolo da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2022). Após o ajuste de cada fator de velocidade 0 a 120 RPM, efetuou-se a leitura dos valores de viscosidade e tensão de cisalhamento, a temperatura de 25°C ±2°C, e os reogramas representados por gráficos.

Figura 20. Viscosímetro Brookfield DV-II + pro.

4.7.5 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes e microrganismos patogênicos – Controle microbiológico da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L.

O controle microbiológico da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. foi constituído pela determinação do número total de microrganismos aeróbios e pesquisa de levedura, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (2022), em triplicata. A pomada foi avaliada seguindo a metodologia realizada por Venâncio *et al*. (2015), através do método em placa.

A pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. foi preparada na proporção de 1:10, onde utilizou-se a proporção de 100µL de pomada previamente aquecida para 900µL de óleo mineral, em seguidas diluídas e homogeneizadas nas proporções 1:10, 1:100 e 1:1000 (agitação por 1 minuto em vórtex) em meios de cultura específicos (ágar Caseína-soja, ágar Sacouraud-dextrose, ágar MacConkey, ágar cetrimida, ágar sal manitol e ágar Salmonella-Shigella-SS) e levadas para estufa microbiológica à temperatura de 35°C por 18 a 72 horas de incubação. Existindo a presença de crescimento microbiano, as confirmações das colônias microbianas foram realizadas através do método de coloração de Gram.

4.7.6 Avaliação das características organolépticas

Com relação à cor e ao brilho a análise foi realizada baseando-se sobre a luz do dia ou sob lâmpadas de comprimento de onda similares aos da luz do dia (400nm a 700nm) determinando a cor através de escala padrão (Coral®). Através do toque e sensibilidade a consistência, as suas características foram observadas. Quanto ao odor verificou-se através de

uma pequena amostra colocada diretamente em um recipiente de vidro e foi feita a inalação, lentamente, até que o odor fosse definido. Sendo assim, determinada intensidade do odor foi classificada como: nenhum; fraco; distinto ou forte e, a seguir, a sensação causada pelo odor: aromático; frutuoso; mofado ou rançoso.

4.8 Testes de atividade cicatricial e de colagênese em mucosa jugal de ratos diabéticos.

Nesta fase experimental foram utilizados ratos machos Wistar, pesando 200 a 250g. Os ratos foram armazenados em caixas apropriadas de propileno contendo serragem. Todos os animais receberam ração industrializada (Bio-base®, Águas Frias, Santa Catarina, Brasil) e água *ad libitum* e mantidos em ambiente com temperatura e umidade controlado e ciclos de claro-escuro a cada 12 horas (Figura 21).

Figura 21. Distribuição dos ratos de acordo com os grupos experimentais.

Os 120 animais foram randomicamente divididos, igualmente, em 5 grupos, cada um contendo 8 ratos:

GRUPO 1 (G1): grupo sem tratamento - controle negativo (ratos normoglicêmicos);

GRUPO 2 (G2): grupo sem tratamento - controle positivo (ratos diabéticos);

GRUPO 3 (G3): grupo triancinolona - controle positivo (ratos diabéticos tratados com acetonida de triancinolona);

GRUPO 4 (G4): grupo jucá (ratos diabéticos tratados com pomada orabase de *Libidibia ferrea* L.);

GRUPO 5 (G5): grupo orabase - controle negativo (ratos diabéticos tratados com a pomada orabase sem o princípio ativo).

Os parâmetros, a serem relatados nos tópicos subsequentes, foram analisados nos dias 01, 05 e 10, e, em cada grupo, os animais foram sacrificados para as devidas análises. A aplicação das drogas foi realizada com dispositivos *microbrush* (KG Sorensen®, Cotia, São Paulo, Brasil) estéreis e individuais.

4.8.1 Indução de diabetes

A indução de DM foi realizada pela administração de aloxano (45 mg/kg) diluído em solução salina (0,9%) por aplicação intravenosa e, para tanto, os animais foram anestesiados com ketamina HCl (70 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg) por via intraperitoneal. Após a indução do diabetes, 2mL de sangue foram coletados via plexo retro-orbital para determinação da glicemia. Os animais foram considerados diabéticos quando apresentaram glicemia igual ou superior a 200 mg/dL (SEIDEL *et al*., 2003).

No dia da indução das úlceras orais dos sacrifícios, foram coletadas amostras de sangue novamente para mensuração e confirmação da hiperglicemia nos ratos diabéticos. Os animais que apresentarem níveis de glicemia menores que 200 mg/dL foram excluídos da análise.

4.8.2 Indução ulcerativa

Após 48 horas da indução de diabetes, realizou-se a indução das ulcerativa, os animais foram anestesiados com ketamina HCl (70 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), por via intraperitoneal (Figura 22). Realizou-se a antissepsia bucal com solução de digluconato de clorexidina 0,12 % aplicados com auxílio de pelotas de algodão esterilizadas. A ulceração foi realizada na mucosa jugal esquerda com lâmina de bisturi nº 15 e com auxílio de um demarcador padronizado de 8 mm de diâmetro (Figura 23 e 24). A técnica cirúrgica foi padronizada em todos os animais e realizada por um único operador previamente treinado (CAVALCANTE *et al*., 2011).

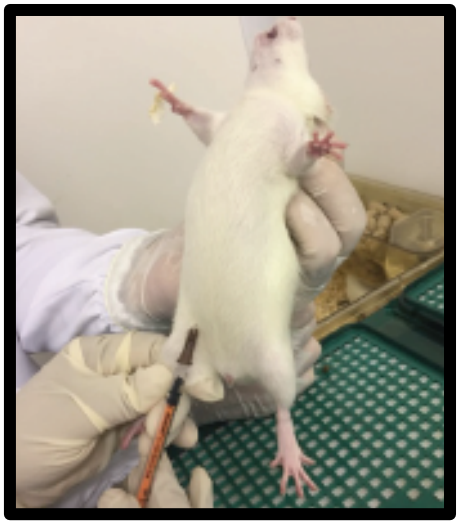


Figura 22. Anestesia intraperitoneal.

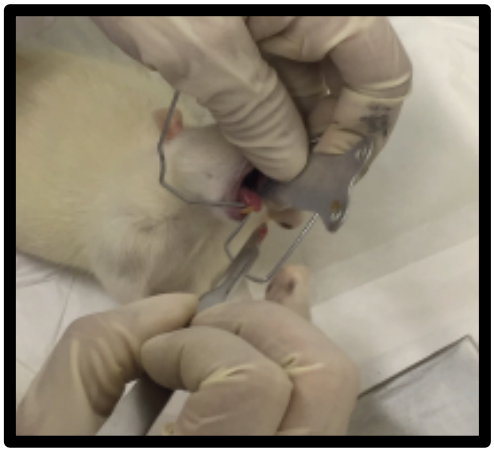


Figura 23. Indução ulcerativa (8cm).

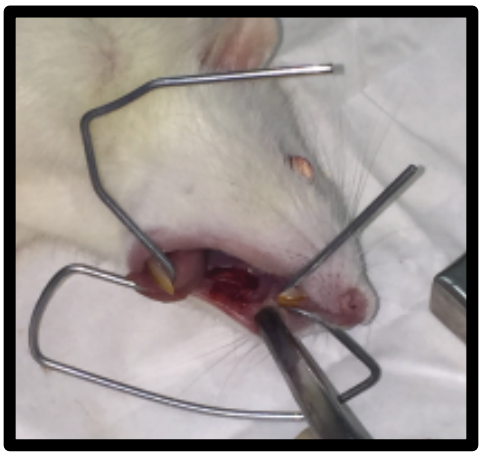


Figura 24. Úlcera induzida – lado esquerdo.

4.8.3 Avaliação Clínica

Os animais foram pesados e tiveram seu sangue coletado nos dias 0 (dia da indução da úlcera) e nos dias de sacrifícios (1º, 5º e 10º). Nos dias de sacrifício, as úlceras foram mensuradas (Figura 25) usando paquímetro digital (L= maior diâmetro; m: menor diâmetro) para calcular a área (Área= π x Maior diâmetro x menor diâmetro). Todas as mensurações foram realizadas pelo mesmo operador (CAVALCANTE *et al*., 2011).

Figura 25. Mensuração ulcerativa com paquímetro digital.

4.8.4 Avaliação da diferença de peso corpóreo

Os animais foram pesados (Figura 26) no momento anterior à indução das úlceras (peso inicial), 24h após o momento de indução (dia 1), e também nos dias subsequentes (dia 5) até o momento da eutanásia (dia 10), e a avaliação de massa corpórea de acordo com a seguinte fórmula:

Variação de Massa corpórea (%) = (Massa final – Massa inicial) / (Massa inicial) x 100.

Figura 26. Pesagem dos animais.

4.8.5 Aplicação dos fármacos

A finalidade da orabase é de atuar como um veiculo adesivo para aplicar a medicação ativa aos tecidos bucais, proporcionando uma cobertura protetora que pode servir para reduzir temporariamente a dor, associada com irritação oral. A aplicação das orabase em todos os grupos (G3, G4 e G5) foi realizada duas vezes ao dia, no período da manhã e no final da tarde, até o dia da eutanásia dos animais.

Para aplicação tópica, os animais foram minimamente mobilizados, pela técnica da contenção pelo dorso para em seguida a medicação ser administrada com o auxílio de um cotonete estéril, em quantidade suficiente para cobrir o diâmetro ulcerativo (Figura 27a, 27b e 27c). Aplicou-se o Oncilom® no grupo 3 (G3), a pomada de orabase de Jucá no grupo 4 (G4) e somente a orabase no grupo 5 (G5), contendo quantidade suficiente para cobrir a ulceração.

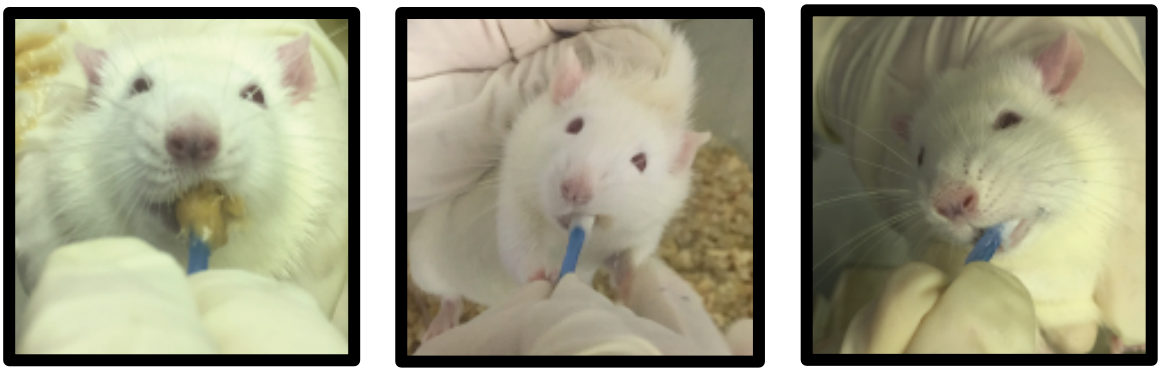


Figura 27a, 27b e 27c. Aplicação dos agentes testes nos grupos específicos.

4.8.6 Análise histopatológica

Após o sacrifício, coletou-se fragmentos da mucosa jugal (Figura 28), identificados e armazenados em solução de formol neutro 10% durante o período de 24 horas (Figura 29). Após fixação em formol 10% tamponado, os espécimes foram analisados macroscopicamente, submetidos a desidratação em série crescente de álcool, diafanizados em xilol e impregnação em parafina (Figura 30). Em seguida, incluiu-se os fragmentos em blocos de parafina (figura 31) em temperatura ambiente e cortados em micrótomo semi-automático em espécimes de 5 µm de espessuras (Figura 32), os quais foram incorporados em lâminas em banho-maria (Figura 33) e corados por hematoxilina-eosina (HE – Figura 34) (CAVALCANTE *et al.,* 2011).

Figura 28. Remoção do fragmento.

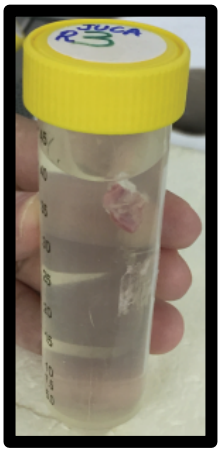


Figura 29. Formol 10%.

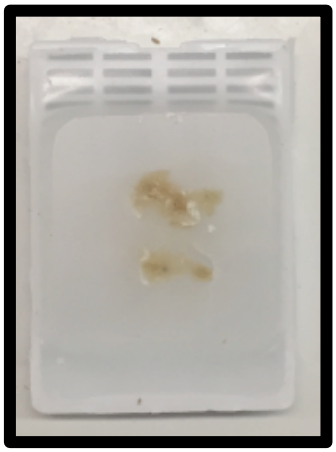


Figura 30. Bloco de parafina.

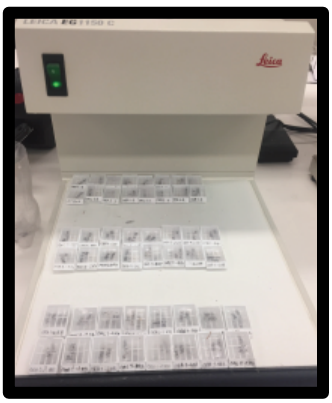


Figura 31. Solidificação do bloco.

Figura 32. Micrótomo.

Figura 33. Banho-maria.

Figura 34. Lâminas histológicas dos grupos experimentais (Coloração HE).

Quanto à leitura das lâminas, foi realizada em microscópio óptico (200x), e as características histológicas ulcerativas juntamente com os seus correspondentes das fases de cicatrização foram descritos. As leituras foram realizadas por um único examinador, especialista em Patologia Oral, previamente calibrado. A calibração foi realizada por meio da análise de 10 fotos de lâminas de biópsia de mucosa bucal com a identificação de variáveis de leitura a serem observados no estudo (scores diferentes). Estas fotos foram codificadas e representados ao examinador após 7 dias e em ordem aleatória. Após a segunda leitura, os parâmetros histopatológicos foram determinados e atribuídos por escores de 0 a 4 de acordo com critérios previamente publicados (Tabela 2) (CAVALCANTE *et al.*, 2011).

Tabela 2. Análise microscópica de úlceras orais induzidas (escores histológicos).

	Epitélio	**Conjuntivo**
Escore 0	Sem úlcera	Remodelado
Escore 1	Sem úlcera	Fibrose e inflamação crônica leve
Escore 2	Com úlcera	Fibrose e moderada inflamação crônica
Escore 3	Com úlcera	Processo inflamatório crônico (tecido de granulação)
Escore 4	Com úlcera	Processo inflamatório agudo (vasos dilatados, infiltrado inflamatório misto e neutrófilos)

4.8.7 Análise da colagênese

Para análise de colágeno total e colágenos tipo I e tipo III foram realizados cortes de 3 μm para coloração por Picrosirius Red. Após desparafinização em estufa a 60°C por 3h, dois banhos de 5 minutos em xilol, reidratação em solução de etanol decrescente (90%, 85% e 70%) com posterior lavagem com água, as lâminas foram incubadas em solução de Picrosirius

(ScyTek®) e contracoradas com hematoxilina de Harris por 10 segundos. Para quantificação dos diferentes tipos de colágeno, seis microcampos de cada lâmina foram fotografados no aumento de 200x utilizando microscópio (DM2000, Leica®) com câmera (DFC295, Leica®) e software (LAS, Leica®) acoplados utilizando a luz convencional e a luz polarizada.

As imagens foram exportadas para o ImageJ®, para análise do percentual de área corada em vermelho (colágeno total), áreas com coloração vermelho-alaranjada (colágeno tipo I) e áreas com coloração verde (colágeno tipo III).

Para determinar a porcentagem de área total de colágeno, a calibração foi feita usando o comando Color Threshold (Image > Adjust > Color Thersold) na função RGB, para as cores Vermelho (Mínimo de 71 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 69) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 92). Depois da calibração, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary) e foi mensurada a porcentagem de área de colágeno total marcada em vermelho (Analyse > Analyse Particles).

Nas imagens obtidas através da luz polarizada, o mesmo protocolo foi realizado, ajustando-se as cores na função RGB para Vermelho (Mínimo de 0 e Máximo de 255), Verde (Mínimo de 0 e Máximo de 255) e Azul (Mínimo de 0 e Máximo de 32).

Após ajuste, as imagens foram convertidas para a escala de cor de 8-bits (Image > Type > 8-bit), binarizadas (Process > Binary > Make Binary), e foi mensurada a porcentagem de área de colágeno marcada em amarelo-avermelhado (correspondente ao colágeno tipo I). Em seguida, do total da área marcada em vermelho, foi separado um percentual da região ocupada somente pela marcação amarelo-avermelhada. A área verde-esbranquiçada, relativa ao colágeno tipo III, foi obtida pela subtração da região total marcada em vermelho e o percentual marcado unicamente pela cor amarelo-avermelhada. Considerou-se a média dos campos avaliados, os quais foram expressos em forma de média ± EPM (ALVES *et al*., 2015).

4.8.8 Reação imuno-histoquímica para IL-1, TNF-α, TGF-β e CD31

Após confecção dos blocos, foram realizados cortes de 3 μm dispostos sobre lâminas silanizadas para reação de imunohistoquímica através da técnica da estreptavidina-biotinilada. Após desparafinização e reidratação, foi feita a recuperação antigênica com solução de citrato pH 6,0 ou Tris EDTA pH 9,0. Posteriormente ao resfriamento em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em Solução Tampão de Fosfato (PBS) e submetidas ao bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em PBS por 30 minutos.

Após lavagens em PBS, foi realizada a incubação overnight (24 horas) com os anticorpos primários para marcadores inflamatórios anti-IL1 (neutrófilos) e anti-TNF-α (neutrófilos), para o fator de crescimento anti-TGF-β (fibroblastos) e para a molécula de adesão celular endotelial plaquetária anti-CD31(eosinófilos e miofibroblastos).

O controle positivo das reações para os anticorpos anti-IL1, anti-TNF- α e anti-TGF- β foi realizado com amostras de úlcera traumática de boca. Para o anticorpo anti-CD31 foi utilizada amostra de rim de rato. O controle negativo foi realizado suprimindo-se o anticorpo primário da reação em um dos cortes. Após lavagens com PBS, as lâminas foram incubadas com o polímero HRP IgG-anti-rato-anti-coelho (Dako®) por 30 minutos, feita revelação com 3,3-diamino-benzidina (DAB) (Abcam®), contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 10 segundos e montagem com Entellan®.

A avaliação imunohistoquímica quantitativa foi realizada por dois observadores diferentes para todas as lâminas, analisou-se os marcadores para avaliar a IL-1 e TNF-α nos dias 01 e 05 e para os marcadores de TGF-β e CD31 nos dias 05 e 10. Foram fotografados cinco microcampos (aumento 400x) para os marcadores anti-IL1, anti TNF-α e anti-TGF-β e três microcampos para o marcador anti- CD31, seguindo a mesma metodologia descrita para as lâminas coradas por Picrosirius Red, em regiões com maior concentração de células imunocoradas localizadas em tecido conjuntivo (ou tecido de granulação) próximo à área ulcerada. Em seguida, foram contados o total (somatório) de células/vasos imunomarcados, utilizando o comando Cell counter do software ImageJ® e o somatório foi utilizado como unidade amostral. O resultado foi expresso como média ± Erro Padrão da Média (EPM) (adaptado de BRIZENO *et al*., 2016; TEÓFILO *et al*., 2020).

4.8.9 Método de indução de morte e descarte da carcaça

Após o sacrifício dos animais, eles foram submetidos à eutanásia por superdosagem do barbitúrico (Pentobarbital sódico, 150mg/kg, Intravenosa), e acondicionados em sacos de risco biológicos para serem armazenados no Biotério Central até o momento de coleta e incineração. As coletas de material para a leitura histopatológica ocorreram nos dias 01, 05 e 10, com o sacrifício dos animais de cada grupo.

4.9 Análise Estatística

Os resultados quantitativos de avaliação dos testes físico-químicos do controle de qualidade, que apresentarem simetria, estão apresentados por meio de tabelas e gráficos de box-

plot, utilizando o nível de significância fixado na aplicação dos testes estatísticos foi de 5%. Para a análise do pH e de densidade as comparações entre as condições de armazenamento e tempo de estudo foram realizadas usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn (CONOVER, 1999, VIEIRA 2004). As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico R Core Team (2023) e o Posit team (2023).

As comparações entre os tratamentos nos grupos e tempos para análise dos testes *in vivo* como: variação de peso, área e diâmetro ulcerativo, escores histológicos, atividade de colagênese, e os mediadores inflamatórios (IL-1, TNF-α, TGF-β e CD-31) também foram realizadas através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn. Para comparar se houve diferença entre a massa final e a inicial dentro dos grupos, foi aplicado o teste pareado de Wilcoxon (Conover, 1999; VIEIRA 2004). As análises estatísticas foram feitas utilizando o programa estatístico R Core Team (2023) e o Posit team (2023), considerando nível de significância de $p< 0,05$ (VIEIRA, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do extrato de *L. ferrea* L. por LC-MS

O perfil fitoquímico demonstra a presença de inúmeros compostos (taninos, flavonoides, polifenóis), porém cinco compostos são majoritários, dentre eles o ácido gálico, ácido elágico e orientina conforme cromatograma apresentado na figura 35 e tabela 3.

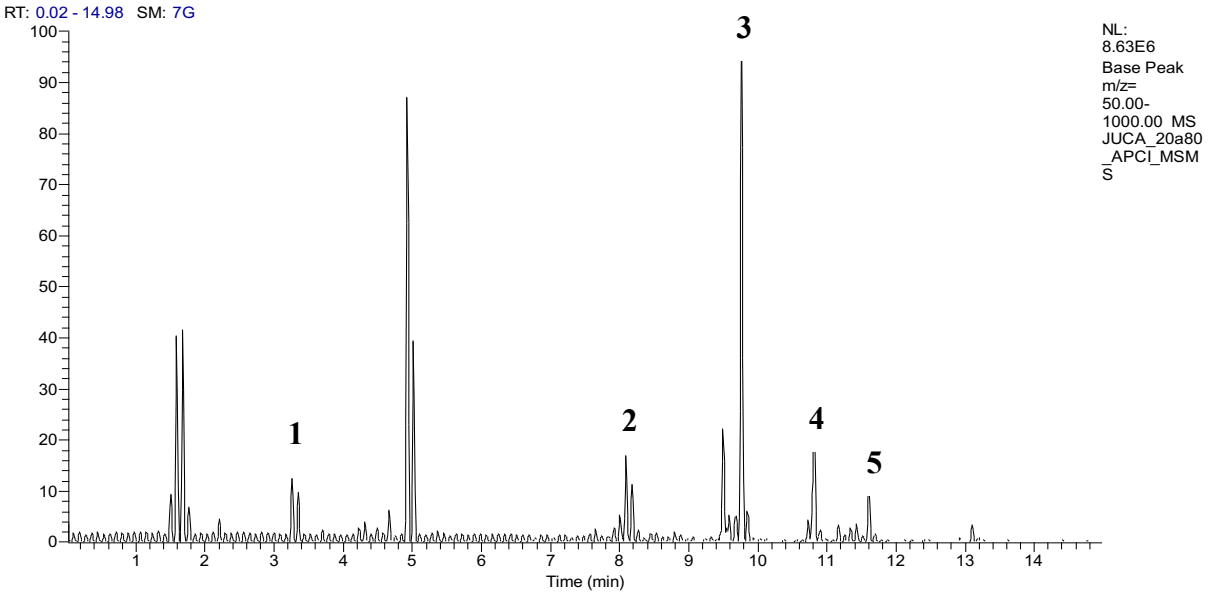


Figura 35. Cromatograma do extrato de *Libidibia ferrea* L. a 7,5%.

Tabela 3. Substâncias caracterizadas por LC-MS/MS em extrato de *Libidibia ferrea* L. a 7,5%.

Pico	R.T	$[M-H]^-$	Fragmentações	Substância	λ_{max}/nm	Referência
1	3,34	169	-	Ácido gálico	216, 272	(PEDROSA et al., 2016)
2	8,07	447	357; 285	Orientina	217, 256,364	(SPRENGER., 2013)
3	9,76	447	315; 207; 137; 109	Diglicosídeo dihidroxibenzoato	210, 248, 364	(ROSA et al., 2021)
4	10,79	301	284; 229; 201; 185	Ácido elágico	209, 253,367	(SILVA et al., 2019)
5	11,6	315	301; 109	Isorhamnetina	209, 246, 364	(PEDROSA et al., 2016)

Neste estudo as análises do perfil do extrato hidroalcóolico de *L. ferrea* L. foram realizadas por HPLC-DAD-MS/MS, identificando 5 picos principais, como a substância **3** responsável pelo pico mais intenso com o Rt 9.76 min e $[M-H^+]$ 447 fragmentado em *m/z* 315 pico base, *m/z* 207, *m/z* 137 indicando a perda de uma hidroxila da porção benzoato e *m/z* 109

referente à perda de CO_2 do mesmo, compatíveis com o ácido glicosilado Diglicosídeo dihidroxibenzoato, composto determinado através da mesma fragmentação química por Rosa *et al*. (2021). A substância **1** (Rt 3.34 min) expressou unicamente o íon molecular *m/z* 169 correspondente ao ácido gálico desprotonado de acordo com a ordem da referência de fragmentação por Pedrosa *et al.* (2016). A substância **2** (Rt 8.07 min) indica uma luteolina glicosilada cuja desprotonação gerou [M-H^+] 447 e dois fragmentos *m/z* 357 (pico base) e *m/z* 285 pico indicador do flavonoide, orientando assim para a substância conhecida por orientina de acordo com a ordem da referência do artigo de Sprenger (2013).

A quarta substância indicada na análise foi o ácido elágico tendo como íon molecular e pico base *m/z* 301 e os fragmentos *m/z* 284, *m/z* 229, *m/z* 201 e *m/z* 185, nessa ordem de intensidade, corroborando os picos com a estrutura da molécula encontrados por Silva *et al.* (2019) de acordo com a ordem da referência deste autor. O pico 5 (Rt 11,6 min) foi indicado como Isorhamnetina, pois apresentou o íon molecular m/z 315 com fragmentações de m/z 301 equivalente à perda de uma metila e o fragmento m/z 109, possibilitando a presença do flavonoide corroborando com os achados de Pedrosa *et al*. (2016).

As propriedades terapêuticas dos compostos químicos encontrados na *L. ferrea* L. nesse estudo está evidenciada em outros ensaios farmacológicos que demonstraram atividade antimicrobiana, anti-inflamatórias (inibindo a síntese de prostaglandinas inflamatórias) e cicatrizantes (ALMEIDA *et al*., 2021; DROZINO *et al*., 2017; LINS *et al*., 2022; MACEDO *et al*., 2020; SAMPAIO *et al*., 2009). Kobayashi *et al*. (2015) e Magalhães *et al*. (2015) analisaram o perfil fitoquímico da *L. ferrea* L. revelando a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos, sesquiterpenolactonas e antraquinonas, dentre outros compostos corroborando com os achados deste estudo.

O processo de extração está relacionado a difusão das substâncias presentes nos órgãos vegetais para o líquido extrator, portanto a escolha do melhor método extrator está ligada à agitação, temperatura, tempo, teor de compostos a serem extraídos e polaridade dos solventes (NERI, 2016). O presente estudo utilizou o extrato hidroalcoólico da casca do caule obtidos a partir do método de decocção por refluxo, esta técnica extrativa utilizada contrapõe a metodologia proposta por Oliveira *et al*. (2013) que preparou um extrato de *L. ferrea* L. através da técnica de infusão, bem como por Conde *et al*. (2016), onde a extração foi realizada por percolação a temperatura ambiente, utilizando o metanol como líquido extrator.

Quando comparamos a extração dos constituintes químicos do álcool etanol com metanol, este é mais eficiente na extração de compostos fenólicos quando comparado ao etanol (SPAGOLLA *et al*., 2009), porém como o método extrativo escolhido para preparo do extrato

otimiza a extração dos compostos químicos, com poucas perdas, foi utilizado o etanol como líquido extrator no presente estudo. É importante ressaltar ainda que o extrato produzido neste presente estudo teve a durabilidade de 6 anos, apresentando a mesma caracterização físico-química durante todo esse período, o que corrobora com os dados discutidos aqui quanto a otimização dos compostos químicos através da metodologia de decocção por refluxo e redução a extrato seco no Spray Drayer® para estabilização do mesmo.

A maioria dos autores sugere que os taninos são os responsáveis pela ação farmacológica em virtude de sua propriedade adstringente (OLIVEIRA *et al*., 2010), porém são compostos antioxidantes que atuam na reparação de feridas (SCHAFER; WERNER, 2008). Ao mesmo tempo que os taninos têm a capacidade de formação de uma barreira mecânica auxiliando no processo de cicatrização de úlceras como demonstrado por Vasconcelos *et al*. (2010), o que pode estar relacionado com os resultados encontrados na caracterização físico-química destes compostos e sua indicação farmacológica cicatrizante e anti-inflamatória da formulação testada.

No que se refere à atividade cicatricial da formulação a base de Jucá, Melo *et al*. (2022) demonstraram a presença de compostos químicos com atividade anti-inflamatória e cicatrizante de uma formulação a base de *L. ferrea* L., testando a formulação em úlceras induzidas em mucosa jugal de ratos normossistêmicos, evidenciando a redução significativa das úlceras tratadas com a formulação fitoterápica.

5.2 Testes físico-químicos de controle de qualidade

A escolha da forma farmacêutica ideal torna-se necessária para melhor incorporação do princípio ativo, bem como fácil manipulação e melhores resultados farmacológicos. A pomada orabase de *L. ferrea* L. demonstrou ser de fácil manipulação e manuseio; as pomadas estão destinadas a serem aplicadas sobre a pele ou sobre certas mucosas com a finalidade de exercer um efeito local permitindo a penetração dos compostos farmacológicos. As mesmas devem apresentar compatibilidade físico-química frente aos princípios ativos, embalagem, fatores ambientais para garantir sua conservação. As pomadas apresentam diversas classificações, porém em sua maioria apresentam em sua formulação somente uma fase oleosa; na formulação proposta a pomada orabase apresentou componentes oleosos caracterizando a formulação com apenas uma fase oleosa, contendo vaselina e óleo mineral que fornecem a formulação ação emoliente (SOUZA, 2016).

Como a formulação proposta tem a característica de orabase que permite melhor aderência à mucosa, foi escolhida a carboximetilcelulose (CMC), pois além de ter

compatibilidade com outros componentes da formulação é um excelente polímero de adesão, principalmente em mucosas orais, permanecendo por mais tempo aderida no local de aplicação. Estudos relataram que apesar do CMC ser um ótimo polímero para aderência de mucosas, existem outras opções disponíveis para serem utilizados em formulações oleosas, dentre eles a maltodextrina. Contudo, o CMC é solúvel na formulação e tem excelente propriedade como aditivo em formulações farmacológicas, sendo uma substância compatível com o pH fisiológico (LANDOVÁ *et al*., 2013; MAZZARINO, 2014; OLIVEIRA, 2018; VILLANOVA; ÓREFICE; CUNHA, 2010).

Na produção de uma forma farmacêutica semissólida há que se considerar como testes de controle de qualidade: características organolépticas, envolvendo aspectos visuais como transparência, cor e aspectos sensoriais; comportamento reológico por meio de teste de espalhabilidade, consistência, penetrabilidade, plasticidade e brilho, coalescência, homogeneidade, pH e doseamento do fármaco (BRASIL, 2022).

5.2.1 Teste de centrifugação

No teste de centrifugação, realizado em triplicatas, observou-se a separação de uma pequena fase oleosa transparente da pomada de *L. ferrea* L. em todos os tempos (0, 1, 2, 3, 6 e 12 meses) e ambientes. Em nenhum tempo e ambiente de armazenamento houve a presença de precipitado. Esta separação pode ser denominada como cremação (instabilidade reversível), conforme observada nas figuras 36, 37, 38, 39, 40 e 41.

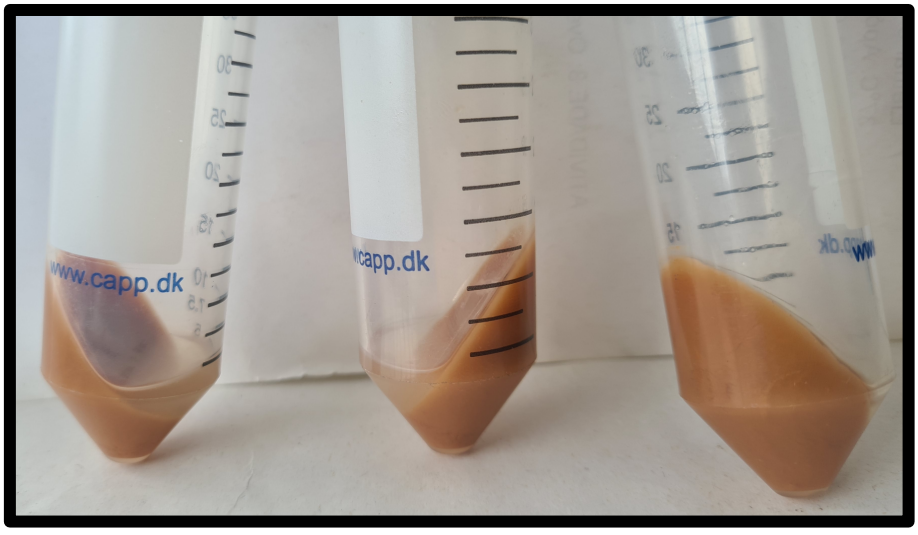


Figura 36. Pomada orabase (tempo 0) após centrifugação.

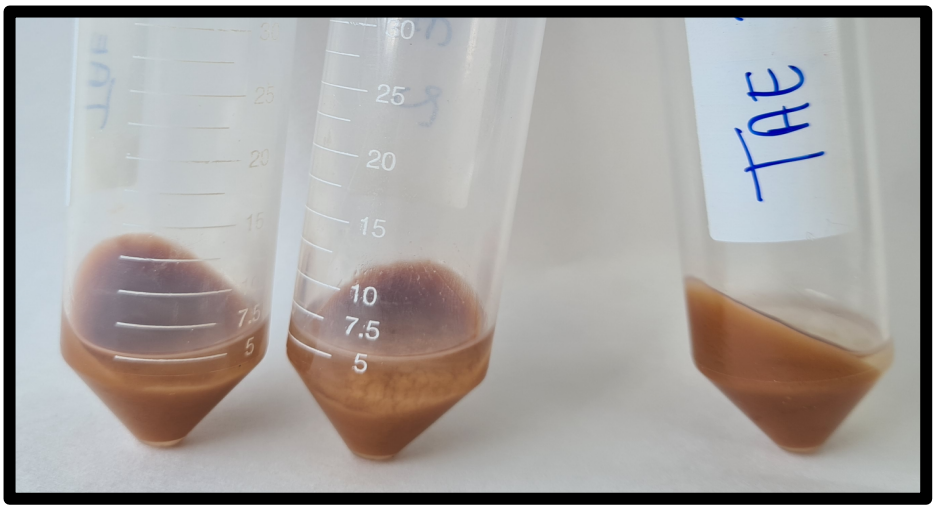


Figura 37. Pomada orabase TAE (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação.

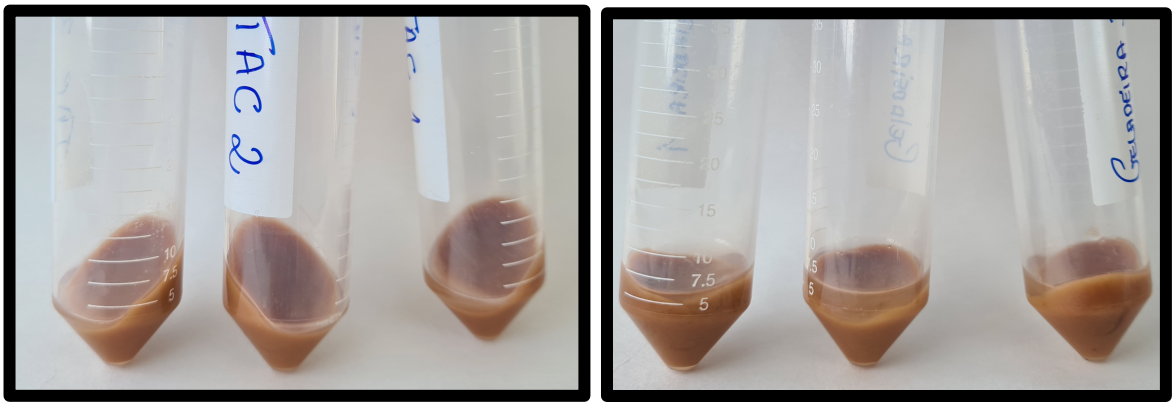


Figura 38 e 39. Pomada orabase TAC e geladeira, respectivamente (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação.

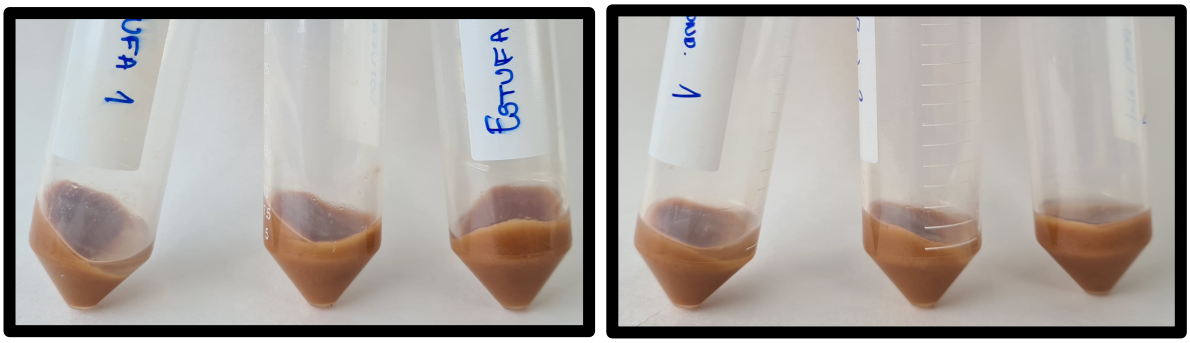


Figura 40 e 41. Pomada orabase estufa e ar-condicionado, respectivamente (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses) após centrifugação.

O perfil de estabilidade de um produto fornece indicações sobre como o produto comporta-se em determinado tempo e condição de armazenamento a que possa ser submetido, desde a sua fabricação até o término da validade, contemplando avaliações físicas, químicas,

físico-químicas e microbiológicas, bem como a aceitação pelo consumidor final do produto. O teste de centrifugação produz um estresse simulando um aumento na força da gravidade, antecipando possíveis instabilidades da formulação (BRASIL, 2007; BRASIL, 2010; BRASIL, 2022; ISAAC *et al*., 2008).

A instabilidade física demonstrada na formulação fitoterápica testada no presente estudo é conhecida como cremação, causada pela diferença de densidade das partículas, contudo a ocorrência de cremação não implica coalescência da formulação e é um processo reversível, portanto, após a agitação a formulação retorna as suas características iniciais, como demonstrado também na formulação padrão - Omcilon®, permitindo a utilização do produto com as mesma propriedades e características que possuía no momento da sua fabricação, dentro dos limites especificados pelo período de tempo determinado neste estudo (BRASIL, 2022; TOPAN, 2012).

5.2.2 Teste de pH

A determinação do pH da pomada de *L. ferrea* L. foi obtido nos tempos experimentais 0, 1, 2, 3, 6 e 12 meses de armazenamento em diferentes locais (Ar Condicionado – AR, Estufa, Geladeira, Temperatura ambiente claro – TAC e Temperatura ambiente escuro - TAE). Para este estudo observou-se na tabela 4 e figura 42 que houve diferença significativa entre as condições testadas, na maioria dos tempos de armazenamento da pomada, com exceção do tempo de armazenamento a 2 meses e 6 meses. No mês 1, o armazenamento em geladeira revelou diferença significativa em comparação com os armazenamentos em estufa e em TAC, sendo este último também significativamente diferente do armazenamento em ar. Em relação aos armazenamentos de 3 meses, estufa e geladeira demonstraram diferenças significativas entre si. Após 12 meses de armazenamento, a geladeira apresentou diferença significativa em comparação com os armazenamentos em ar e em TAC.

Tabela 4. Comparação do pH em relação aos grupos nos diferentes tempos.

	Tempo					
Grupos	**1 mês**	**2 meses**	**3 meses**	**6 meses**	**12 meses**	**Valor-P**
Ar	6,72 (± 0,053) ABa	6,54 (± 0,075) Aab	6,45 (± 0,117) ABabc	5,98 (± 057) Abc	5,29 (± 0,153) Ac	0,0242
Estufa	6,55 (± 0,666) BCa	6,29 (± 0,207) Aab	5,84 (± 0,104) Babc	6,08 (± 0,324) Abc	5,44 (± 0,100) Ac	0,0236
Geladeira	6,82 (± 0,124) Aa	6,83 (±0,091) Aa	6,68 (± 0,015) Aa	6,74 (± 0,127) Aa	6,56 (± 0,187) Ba	0,1690
TAC	6,51 (± 0,472) Ca	6,54 (± 0,075) Aa	6,48 (± 0,14) ABa	5,91 (± 0,560) Aa	5,41 (± 0,260) Aa	0,0618
TAE	6,59 (± 0,472) ABCa	6,30 (± 0,356) Aab	6,41 (± 0,015) ABab	6,13 (± 0,081) Abc	5,68 (± 0,121) ABc	0,0197
Valor P	0,0218	0,0580	0,0256	0,1306	0,0327	

Teste de Kruskal-Wallis - Média (± Desvio Padrão)|Nivel de significancia de 5%.

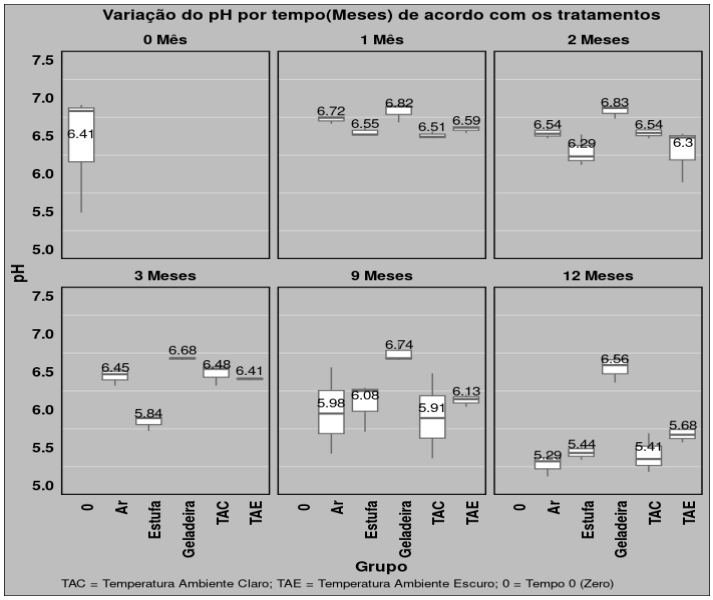


Figura 42. Variação do pH (em meses) de acordo com as condições de armazenamento.

O teste de determinação do pH permite observar se a formulação apresenta degradação ou não com o armazenamento, além de identificar se ela pode ser compatível com a área fisiológica destinada, no presente estudo avalia-se uma formulação destinada para tratamento de úlceras traumáticas, portanto o pH deve ser próximo ao da cavidade bucal - entre 6,59 e 7,2 (BRASIL, 2022; MARAFON *et al*., 2016; OLIVEIRA *et al*., 2013). No presente estudo, a tabela 5 demonstra a média de pH encontrada nos diferentes tempos e locais de armazenamento, com valores da média entre 6,2 e 6,3 que sugere uma possível estabilidade da formulação. Este resultado foi corroborado por Melo *et al*. (2002) e divergido do trabalho realizado por Matos (2016), recomendando que a nova formulação proposta demonstrou resultados bem mais satisfatórios, com o pH perto da neutralidade.

Nos períodos experimentais observou-se a variação no pH, contudo o armazenamento na geladeira foi mais estável não havendo diferença significativa (p=0,1690). Este fato, nos permite inferir que o armazenamento em geladeira com temperatura em torno de 2 °C a 8 °C é o local mais indicado.

Em relação a propriedade biológica, o pH é um importante indicador funcional pois sua característica levemente ácida, próximo da neutralidade (variando de 6,8 a 7,2) contribui para proteção bacteriana e fúngica, além de manutenção da capacidade tamponante e cicatricial, fato evidenciado neste estudo, principalmente quando o relacionamos com o processo de regeneração tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURI., 2005; LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

5.2.3 Teste de densidade

A determinação da densidade foi realizada nos tempos experimentais 0, 1, 2, 3, 6 e 12 meses e em diferentes locais de armazenamento (Ar Condicionado – AR, Estufa, Geladeira, Temperatura ambiente claro – TAC e Temperatura ambiente escuro - TAE). A tabela 5 e figura 43 demonstra os resultados nos tempos experimentais durante os 12 meses de armazenamento, onde pode observar a diferença significativa entre o armazenamento em estufa, ar e TAC, contudo sem diferenças significativas entre TAE e Geladeira, demonstrando melhor estabilidade.

Tabela 5. Comparação da densidade em relação aos grupos nos diferentes tempos.

	Tempo					
Grupos	**1 mês**	**2 meses**	**3 meses**	**6 meses**	**12 meses**	**Valor-P**
Ar	0,84 (± 0,002) Aab	0,84 (± 0,001) Aab	0,86 (± 0,024) Aa	0,83 (± 0,012) Aab	0,80 (± 0,013) ABb	0,0346
Estufa	0,84 (± 0,00) Aab	0,84 (± 0,001) Aab	0,84 (± 0,003) Aa	0,82 (± 0,016) Abc	0,77 (± 0,009) Cac	0,0220
Geladeira	0,84 (± 0,009) Aa	0,84 (± 0,009) Aa	0,84 (± 0,001) Aa	0,75 (± 0,052) Aa	0,84 (± 0,004) Aa	0,1261
TAC	0,84 (± 0,002) Aa	0,80 (± 0,034) Abc	0,80 (± 0,000) Aab	0,77 (± 0,017) Ac	0,78 (± 0,008) BCc	0,0192
TAE	0,84 (± 0,012) Aa	0,84 (± 0,015) Aa	0,84 (± 0,017) Aa	0,80 (± 0,038) Aa	0,84 (± 0,003) Aa	0,3009
Valor P	0,7564	0,1617	0,3310	0,0595	0,0134	

Teste de Kruskal-Wallis - Média (± Desvio Padrão) | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas comparação intragrupos (Linhas) | Nivel de significancia de 5%.

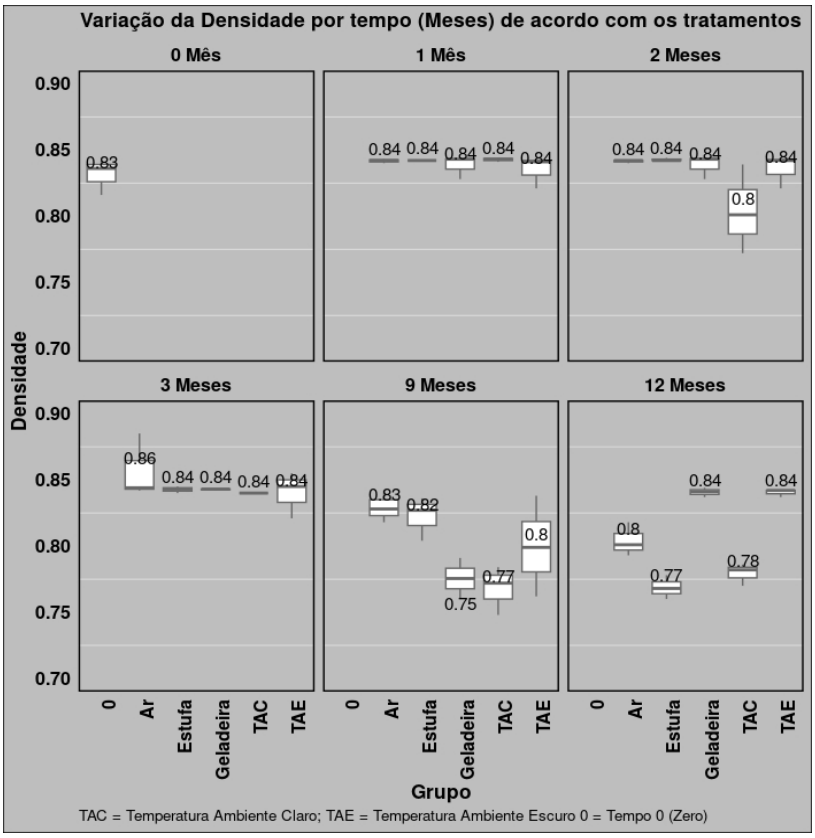


Figura 43. Variação da densidade (em meses) de acordo com as condições de armazenamento.

A determinação da densidade relativa e de massas é de extrema importância para avaliação da estabilidade da fórmula farmacêutica. Quanto mais próxima a formulação tiver da densidade da água mais estável ela se torna, consequentemente melhor a incorporação do princípio ativo e maior teor do princípio ativo, sem perda de propriedades terapêuticas (OLIVEIRA JUNIOR *et al*., 2010). Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com estes autores pois a formulação testada nos tempos e condições experimentais apresentaram valor ideal próximo ao da densidade da água (1g/cm^3), sendo a condição de armazenamento Geladeira demonstrando o valor mais próximo em todos os tempos testados (excluindo o tempo 6 meses), sugerindo uma ótima estabilidade da formulação.

5.2.4 Teste Reológico

Os resultados demonstram que a viscosidade da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. variaram quando aplicado uma taxa de cisalhamento, não obedecendo à lei de Newton para o comportamento de fluidos, no qual a viscosidade é constante. Dessa forma, podemos considerar que a pomada orabase de *L. ferrea* L. é não newtonianas e precisou de uma certa tensão/taxa de

cisalhamento para começar a fluir apresentando, portanto, um provável comportamento pseudoplástico/plástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da tensão, tornando-se mais fluido, de acordo com os dados apresentados no apêndice 1 e os reogramas apresentados nas figuras 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 e 54.

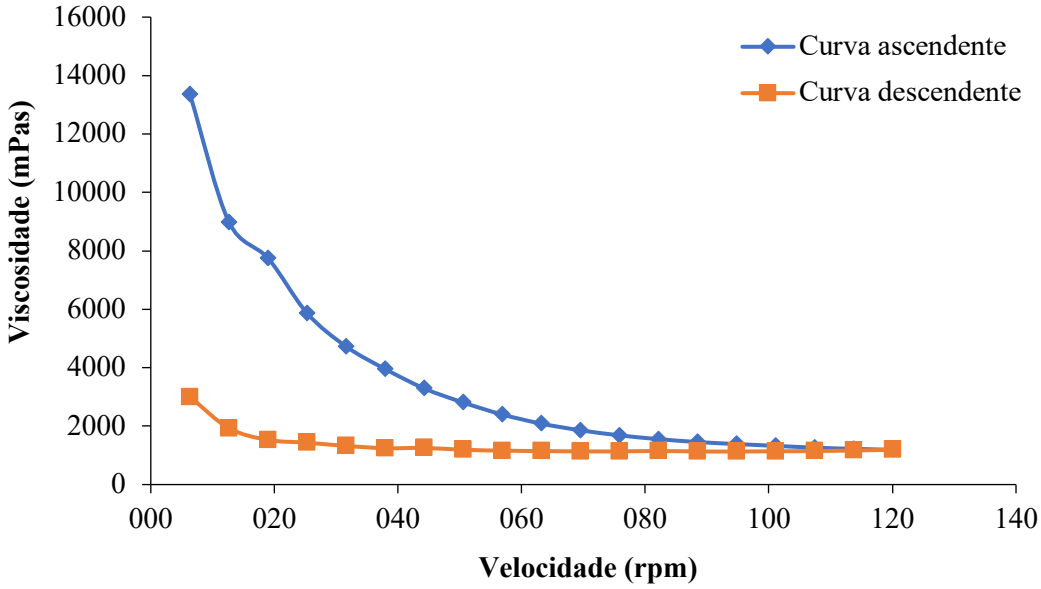


Figura 44. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 0).

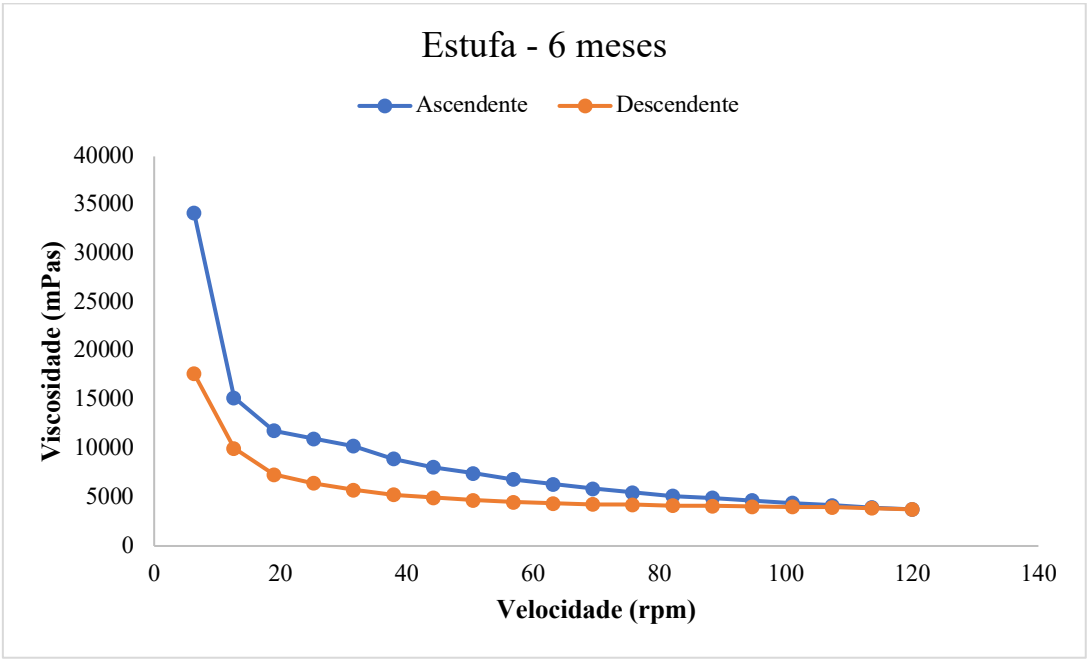


Figura 45. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 - estufa).

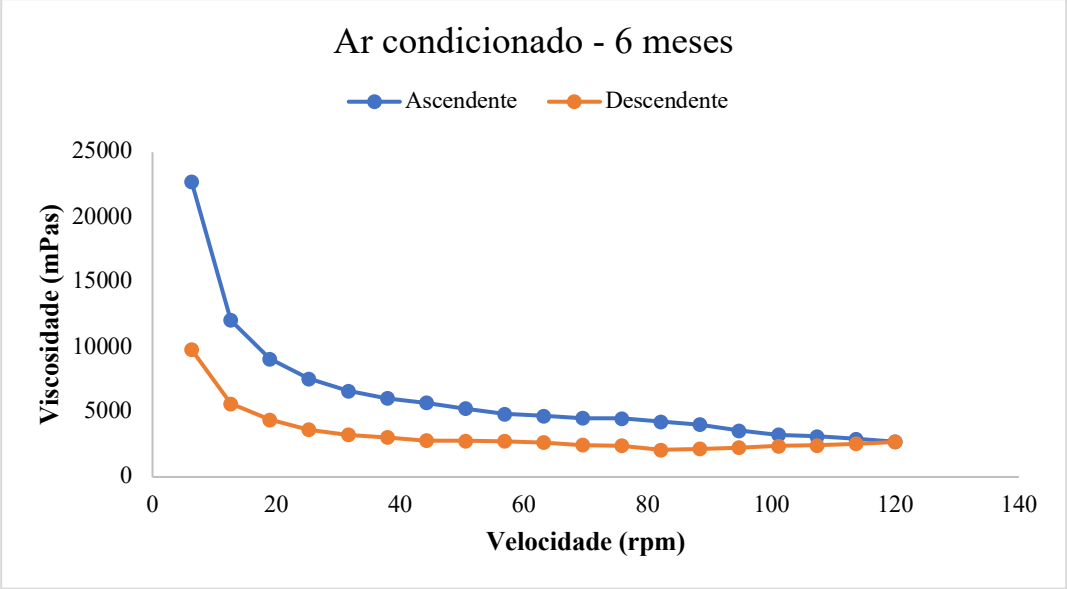


Figura 46. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 – ar condicionado).

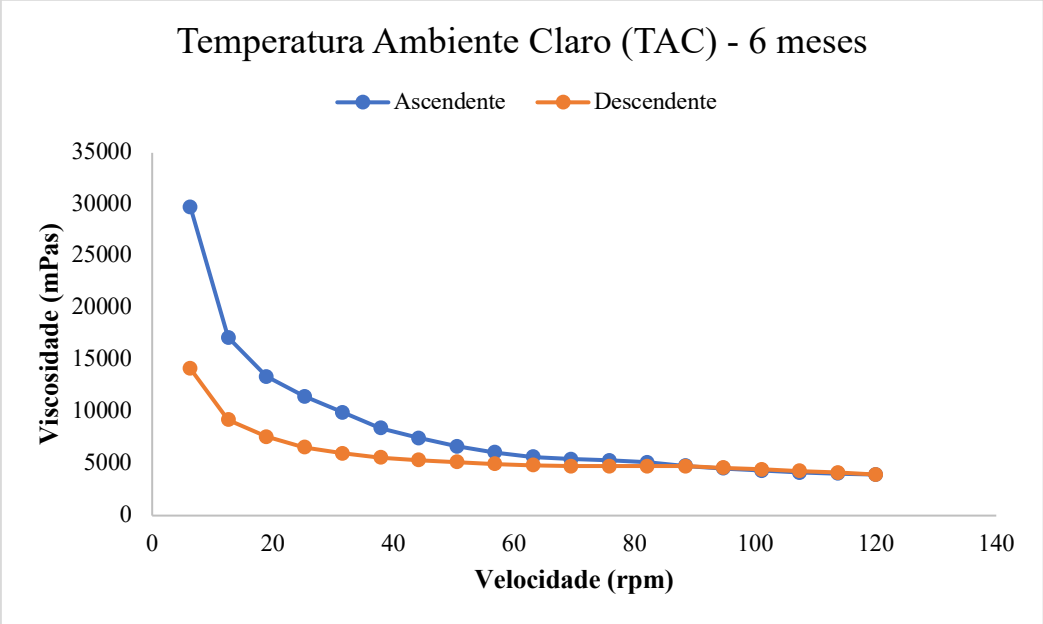


Figura 47. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 – TAC).

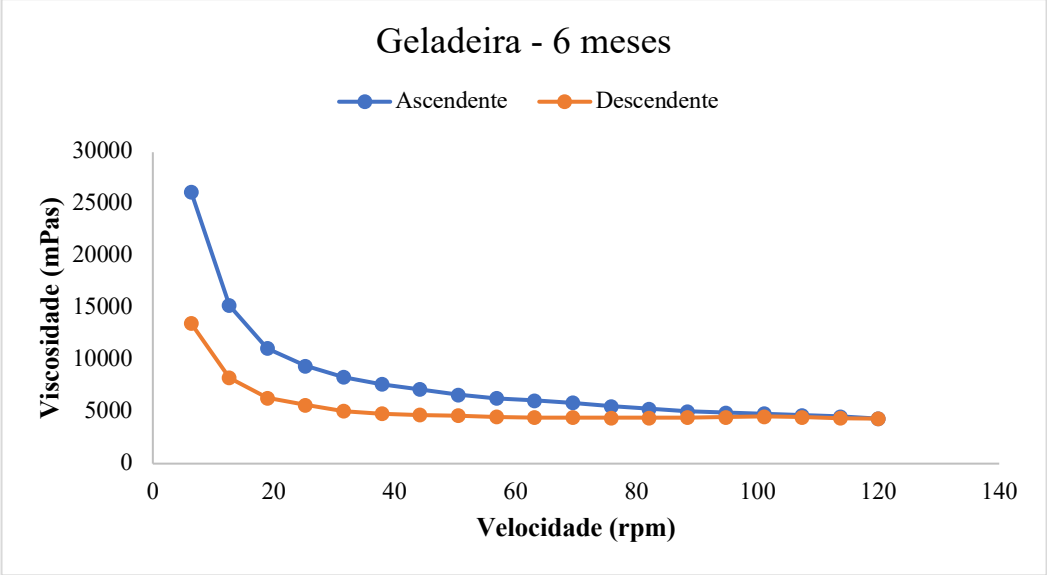


Figura 48. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 – geladeira).

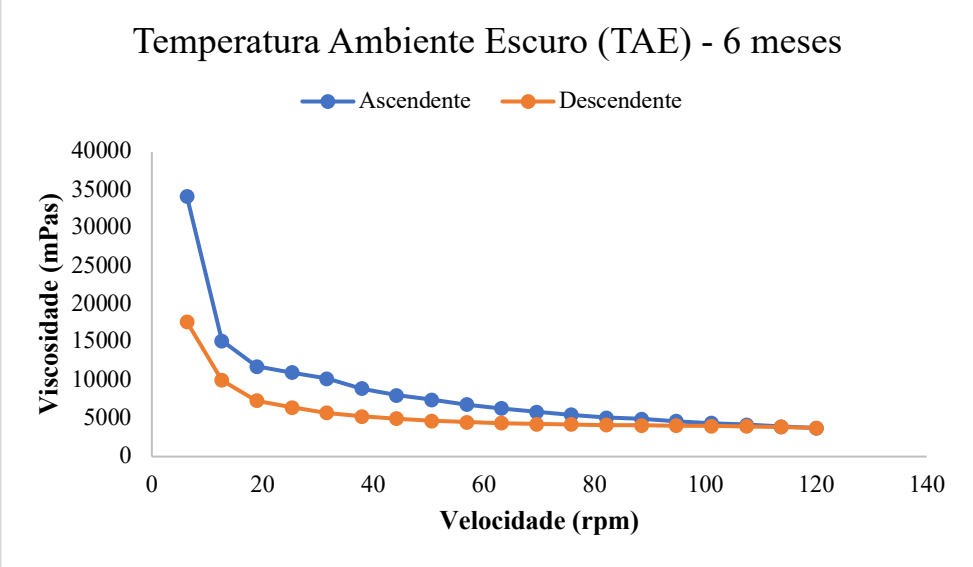


Figura 49. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 6 – TAE).

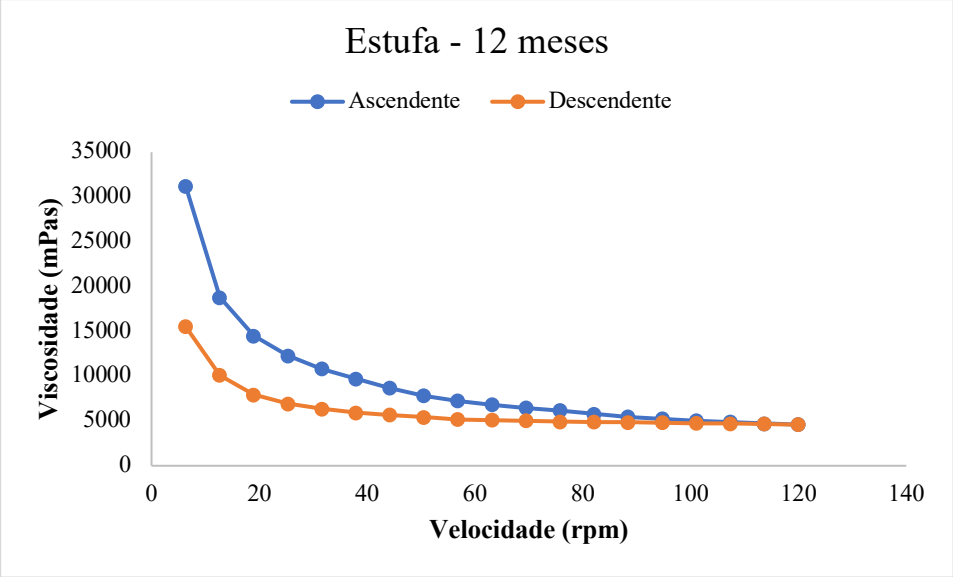


Figura 50. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 – estufa).

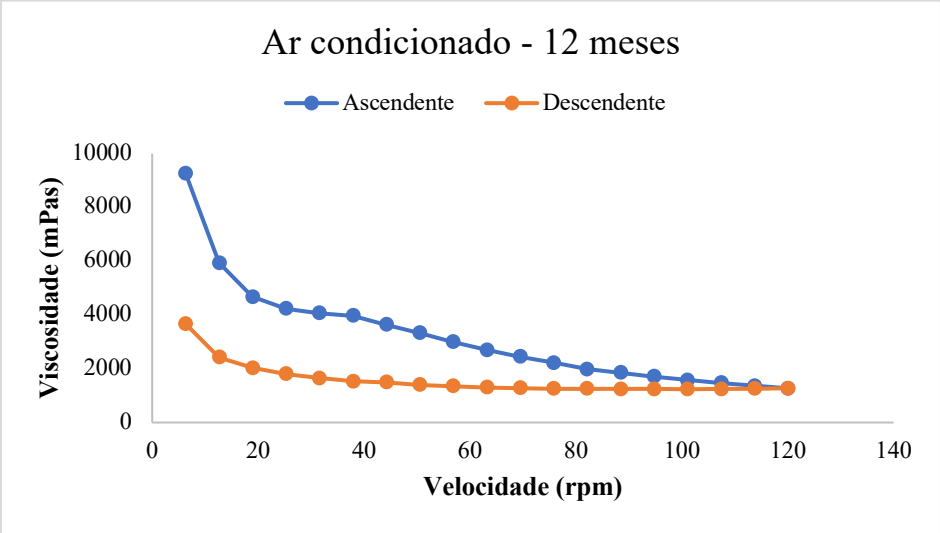


Figura 51. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 – ar condicionado).

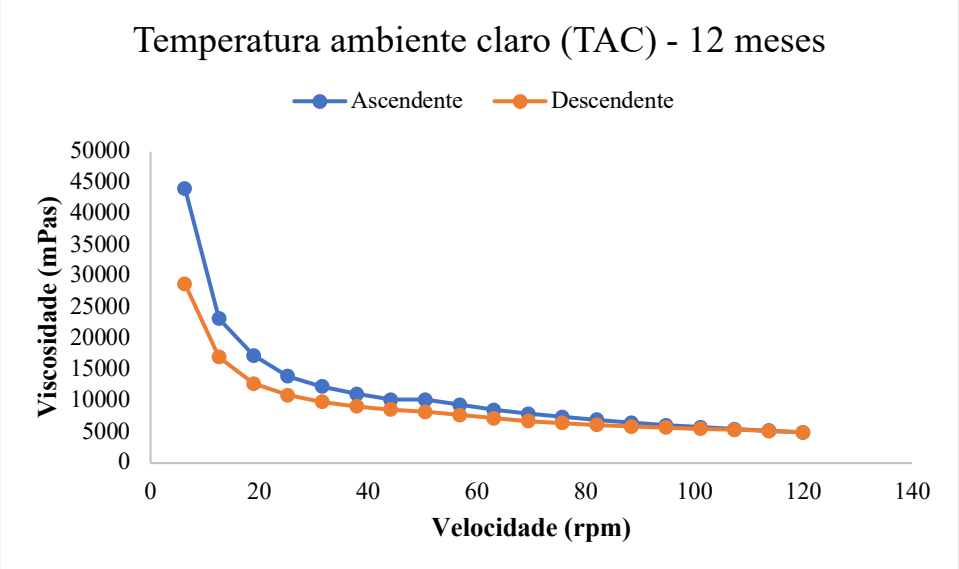


Figura 52. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 – TAC).

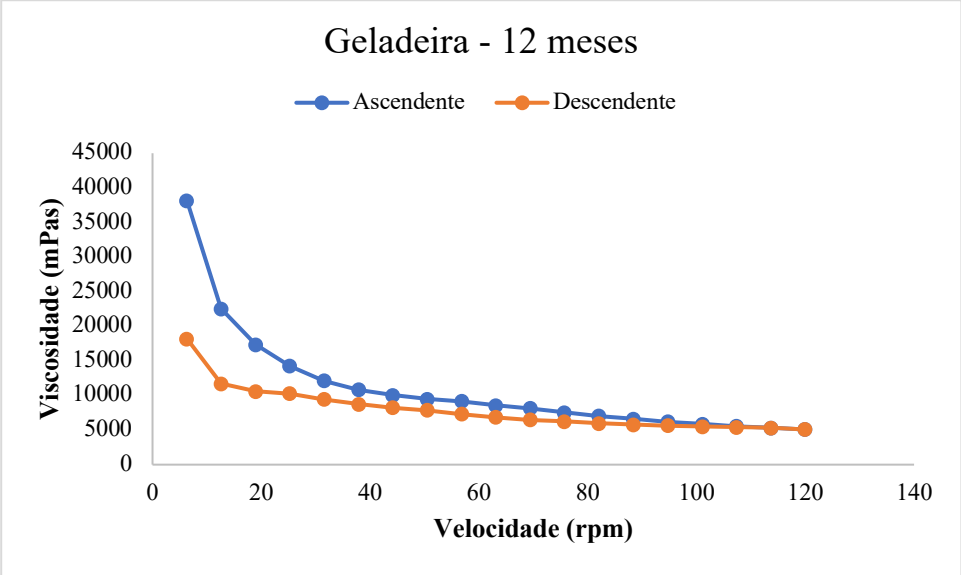


Figura 53. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 – geladeira).

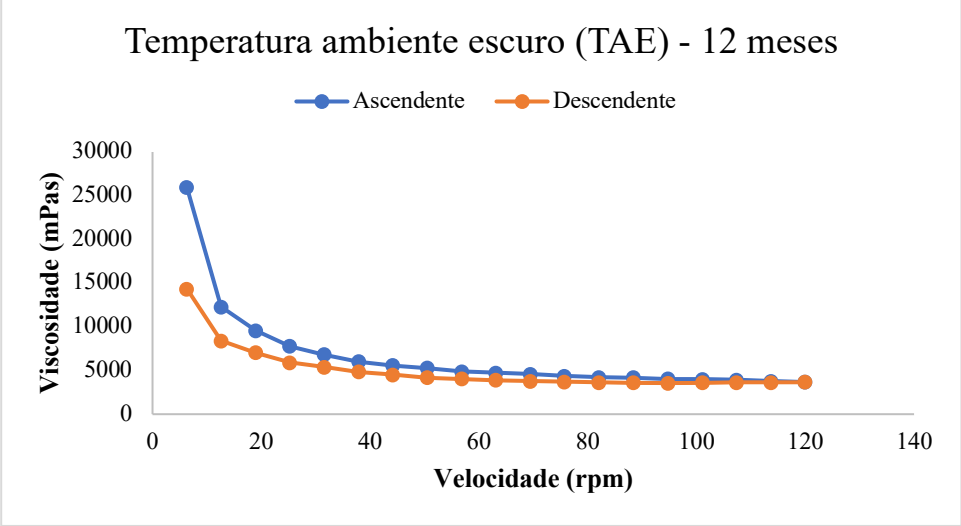


Figura 54. Reograma da pomada orabase de *L. ferrea* L. (tempo 12 – TAE).

Os testes reológicos são amplamente utilizados para testar uma serie de formulações cosméticas e farmacêuticas, devendo ser sensível, precisa e gerando resultados analíticos que poderão ser facilmente reproduzíveis. A sensação e espalhabilidade da pomada durante sua aplicação são questões importantes de aceitação pelo consumidor final do produto, esses fatores podem ser influenciados pela escolha dos componentes da formulação, bem como o seu processo de fabricação, visto que alguns componentes podem desenvolver reações alérgicas nos consumidores e a qualidade do produto deve permanecer a mesma durante todo o seu tempo de validade, por isso o controle de qualidade torna-se um fator primordial para verificar estas variáveis (BRASIL, 2002).

As características reológicas demonstrada nos tempos e condições de armazenamento estão de acordo com as características exigidas ao produto final farmacêutico, corroborando também com os dados avaliados por Melo *et al*. (2022), contudo divergindo com os resultados presentes em uma formulação utilizada por Matos (2016), exprimindo assim que a formulação desta pesquisa apresenta adequadas características reológicas para a forma farmacêutica semissólida proposta, confirmando também a adequada escolha dos componentes de sua formulação.

5.2.5 Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes e microrganismos patogênicos – controle microbiológico da pomada orabase

O teste microbiológico avalia a presença de contaminantes na pomada formulada. Nas condições e meios de culturas testados, não houve presença de contaminantes (bactérias e/ou fungos) em nenhum tempo ou condições de armazenamento.

5.2.6 Avaliação das características organolépticas

Durante a avaliação das características organolépticas foram analisadas a cor, o odor, o brilho e a consistência. As amostras não apresentaram alterações de cor da pomada entre os tempos e condições de armazenamento, caracterizadas pela cor amarronzada clara (Tâmara), determinada através da escala de cor Coral® (Figuras 55 e 56). A pomada caracterizou-se por possuir odor forte e aromático, com presença de brilho e consistência lisa, ausente de granulações.

Figura 55 e 56. Aspecto visual da pomada orabase de *L. ferrea* L. de consistência lisa e brilhante, ausente de granulações (tempo 0) e aspecto visual sem alterações nas condições de armazenamento testadas (tempo 1, 2, 3, 6 e 12 meses), respectivamente.

As características organolépticas constituem o indicativo mais acessível de qualidade, principalmente em formulações semissólidas para determinar possíveis alterações e aceitação do produto pelo consumidor (BRASIL, 2022). Logo, a partir dos resultados obtidos da formulação proposta os testes de controle de qualidade apresentaram instabilidade química reversível, estabilidade física e microbiológica nas condições de armazenamento testadas, demonstrando aparência e coloração agradáveis, bem como sua consistência ao toque, sem presença de contaminantes, não corroborando com os resultados encontrados por Matos (2016), cujo o qual apresentou contaminação bacteriana/fúngica em 60 dias de experimento, contudo resultados semelhantes foram demonstrados por Melo *et al*. (2022) que avaliou condições e testes similares por um período de 60 dias, onde a formulação apresentou resultados favoráveis e similares ao presente estudo.

5.3 Testes de atividade cicatricial, de colagênese e apoptose de fibroblastos em mucosa, análise histopatológica e imunohistoquímica em jugal de ratos diabéticos

Além dos testes de controle de qualidade, é importante, a partir do conhecimento dos compostos químicos da matéria-prima vegetal, determinar a finalidade terapêutica da formulação farmacêutica, para isso, são necessários testes clínicos para a sua avalição.

5.3.1 Avaliação da indução diabética e avaliação clínica

Os ratos *Wistar* foram distribuídos dentre os grupos experimentais, podendo observar de acordo com a tabela 8 as perdas/mortes de animais no G2 e G5 no dia 01, o G3 no dia 05 e 10. A indução diabética foi confirmada nos dias 01, 05 e 10 em todos os grupos experimentais, exceto o grupo G1 que a indução diabética não foi realizada (ratos normossistêmicos), no G2 (3 ratos) não atingiram o valor glicêmico proposto metodologicamente para diabéticos, contudo ainda se encontraram acima do valor glicêmico padrão, o mesmo observou-se nos grupos G4 e G5 (2 ratos). A perda dos animais, observada no G3 (tabela 6) esteve relacionado com o processo de anestesia e relaxamento muscular.

Tabela 6. Distribuição dos animais nos grupos experimentais.

Grupos experimentais	Dia 01	Dia 05	Dia 10
Grupo 1 (G1)	8	8	8
Grupo 2 (G2)	7	8	7
Grupo 3 (G3)	8	5	5
Grupo 4 (G4)	8	8	8
Grupo 5 (G5)	7	8	8

5.3.1.1 Diâmetro ulcerativo

A tabela 7 e a figura 57 mostrou que nos dias 01, 05 e 10 não houve diferença significativa entre os grupos. Nos grupos G1 e G4 há diferença significativa entre os dias. Em relação aos grupos G2, G3 e G5, não há diferença significativa entre os dias 01 e 05, mas ambos diferem do dia 10.

Tabela 7. Maior diâmetro ulcerativo dos grupos experimentais (cm).

	Tempo			
Grupos	**Dia 01**	**Dia 05**	**Dia 10**	**Valor-P**
1	5,91 (± 0,62) Aa	4,64 (± 0,83) Ab	2,86 (± 0,51) Ac	0,0001
2	5,51 (± 0,99) Aa	5,61 (± 0,89) Aa	3,90 (± 0,64) Ab	0,0079
3	5,86 (± 0,57) Aa	5,46 (± 1,34) Aa	3,06 (± 0,89) Ab	0,0092
4	6,59 (± 0,91) Aa	5,35 (± 1,20) Ab	3,17 (± 0,92) Ac	0,0002
5	6,48 (± 0,81) Aa	6,15 (± 0,83) Aa	3,31 (± 0,82) Ab	0,0006
Valor - P	*0,0708*	*0,0658*	*0,1241*	

Média (± Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas comparação intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%.*

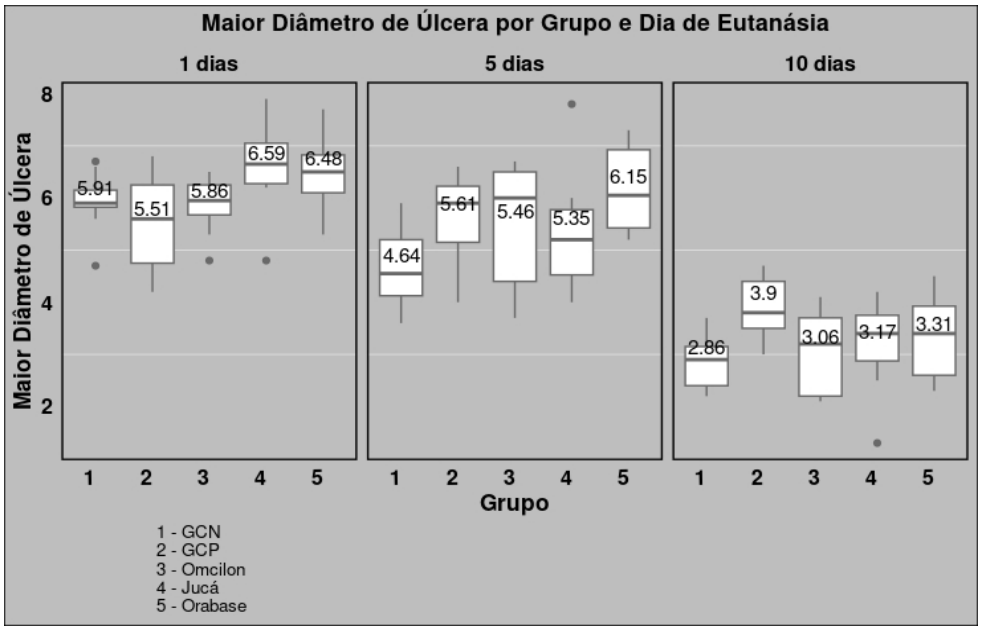


Figura 57. Variação diâmetro maior, por período expeirmental, de acordo com os grupos.

Analisando a tabela 8 e a figura 58 observou-se diferença significativa na área ulcerativa no dia 01 em relação aos dias 05 e 10, entretanto não ocorreu essa diferença nos dois últimos períodos experimentais. O grupo G1 apresentou diferença significativa entre 01, 05 e 10 (entre si). Em relação aos grupos G2, G3, G4 e G5, apresentam diferença significativa entre si nos dias 01 e 10, assim como 05 e 10. Na evolução cicatricial ao longo dos 10 dias, observam-se as

diferenças nos valores dos tamanhos ulcerativos bem como sua redução durante o período avaliado, onde todos os grupos apresentaram uma redução significativa do tamanho, contudo os grupos G1 e G4 foram os que apresentaram os menores tamanhos ulcerativos no final do experimento, indicando as melhores cicatrizações ulcerativas.

Tabela 8. Diferenças das áreas ulcerativas nos grupos experimentais.

	Tempo			
Grupos	**Dia 01**	**Dia 05**	**Dia 10**	**Valor-P**
1	21,04 (± 3,03) Aa	13,54 (± 5,04) Ab	5,27 (± 1,49) Ac	0,0001
2	19,59 (± 6,04) Aa	19,27 (± 4,30) Aa	9,33 (± 2,67) Ab	0,0013
3	22,22 (± 2,92) Aa	22,01 (± 10,64) Aa	6,64 (± 2,79) Ab	0,0056
4	29,27 (± 8,07) Aa	21,25 (± 9,77) Aa	6,42 (± 2,95) Ab	0,0002
5	28,30 (± 5,80) Aa	25,77 (± 7,75) Aa	7,20 (± 3,40) Ab	0,0005
Valor P	*0,0364*	*0,0525*	*0,1069*	

Média (± Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas intragrupos (Linhas) | *Nivel de significancia de 5%*

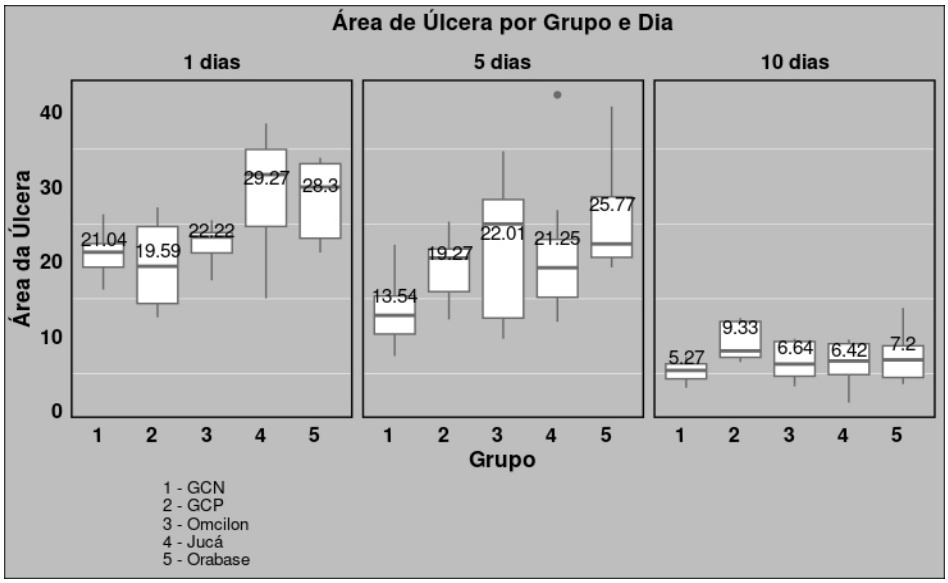


Figura 58. Variação Área da úlcera, por período experimental, de acordo com os grupos.

Na figura 59 observa-se a representação clínica do processo cicatricial em todos os grupos e tempos testados, onde o grupo G1 (normoglicêmicos) apresenta melhor cicatrização clínica com características de cicatrização parcialmente completa no dia 10.

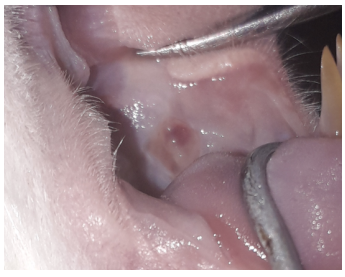
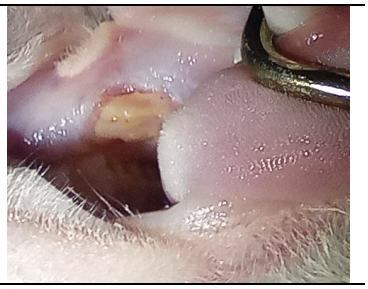
Entretanto, nos grupos de ratos diabéticos apesar da cicatrização parcial com presença de sinais inflamatórios em todos os dias testados, observou-se que os grupos G4 e G5 apresentaram melhores características cicatriciais ao longo dos períodos experimentais, sugerindo que a cicatrização ulcerativa bucal é prejudicada em animais diabéticos. Este

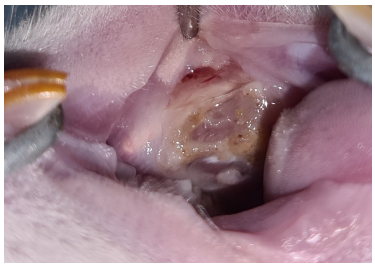
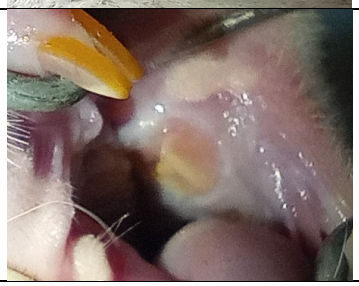
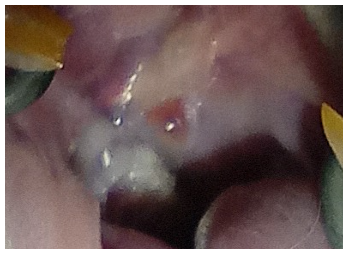
resultado pode ter relação com o aumento do tempo da fase inflamatória encontrado em pacientes diabéticos que pode exacerbar a permeabilidade vascular, diminuir a angiogênese, a fibroplasia e a colagênese.

Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Brizeno *et al*. (2016) que também avaliou a cicatrização ulcerativa bucal em ratos normossistêmicos e diabéticos através da técnica utilizada por este estudo, assim como por Oliveira *et al*. (2010) que avaliou os efeitos do tratamento tópico da *L. ferrea* L. em feridas cutâneas de caprinos demonstrando que a utilização tópica da pomada apresentou eficiência significativa no auxílio da reparação cicatricial. Bem como por Soares *et al*. (2013), os quais avaliaram a atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* ex. TUL. *Var ferrea* e da *Aloe vera* (L.) BURN. F. em lesões cutâneas totais em ratos. Contudo, as duas pomadas fitoterápicas não apresentaram diferença estatística significativa, portanto, ambos produtos farmacêuticos apresentam poder cicatrizante quando comparado ao grupo controle utilizado.

Melo *et al.* (2022) avaliaram clinicamente a cicatrização de úlceras bucais durante um período de 10 dias, onde foi observado que os ratos tratados com uma formulação orabase de *Libidibia ferrea* L. apresentaram o processo cicatricial mais rápido e eficiente em relação aos demais grupos testados, corroborando com os resultados aqui apresentados cuja a utilização da pomada orabase de *Libidibia ferrea* L., em ratos normossistêmicos e diabéticos, favoreceu clinicamente o reparo tecidual mostrando a sua benéfica utilização.

Figura 59. Representação clínica das úlceras orais dos grupos e tempos testados.

	DIA 1	**DIA 5**	**DIA 10**
(G1)			
(G2)			

(G3)			
(G4)			
(G5)			

5.3.2 Avaliação da diferença de peso corpóreo

A tabela 9 e a figura 60 exibem o resultado dos testes. Na comparação intragrupos, nota-se que no grupo G1, a taxa de variação difere em pelo menos um dos dias (Valor - p = 0,0012). Os dias 01 e 05 não diferem, mas ambos diferem do dia 10. Em relação ao grupo G4, há diferença significativa na taxa de variação (Valor - p = 0,0101). Nos grupos G2, G3 e G5, não há diferença significativa entre a taxa de variação em relação aos dias.

Na comparação entre os grupos, observa-se que no dia 01 há diferença significativa (Valor - p = 0,023). Os grupos G1, G2 e G5 não apresentam diferenças entre si, porém diferem dos grupos G3 e G4. Por sua vez, os grupos G3 e G4 não demonstram diferenças entre si. No dia 05, o grupo G3 difere dos demais grupos. Em relação ao dia 10, os grupos G1, G4 e G5, não diferem entre si, assim como os grupos G4 e G3 também diferem entre si e os grupos G2 e G3 não diferem entre si.

Tabela 9. Taxa de variação dos Pesos entre os grupos experimentais.

	Tempo			
Grupos	**Dia 01**	**Dia 05**	**Dia 10**	**Valor-p**
1	3,44 (± 2,38) Ab	2,75 (± 1,18) Ab	7,84 (± 1,65) Aa	0,0012
2	-1,67(± 3,38) ABa	-2,16 (± 8,70) Aa	-3,17 (± 6,14) BCa	0,1869
3	-2,80(± 4,71) Ba	-4,54 (± 2,19) Ba	-15,17 (± 8,43) Ca	0,0832
4	-4,64(± 9,24) Bb	2,75 (± 3,04) Aab	4,45 (± 6,72) ABa	0,0101
5	-0,73(± 4,61) ABa	-0,81 (± 3,40) ABa	6,60 (± 8,42) Aa	0,1154
Valor P	0,0230	0,0091	0,0007	

Média (± Desvio Padrão) |Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas comparação intragrupos (Linhas) | Nível de significância de 5%.

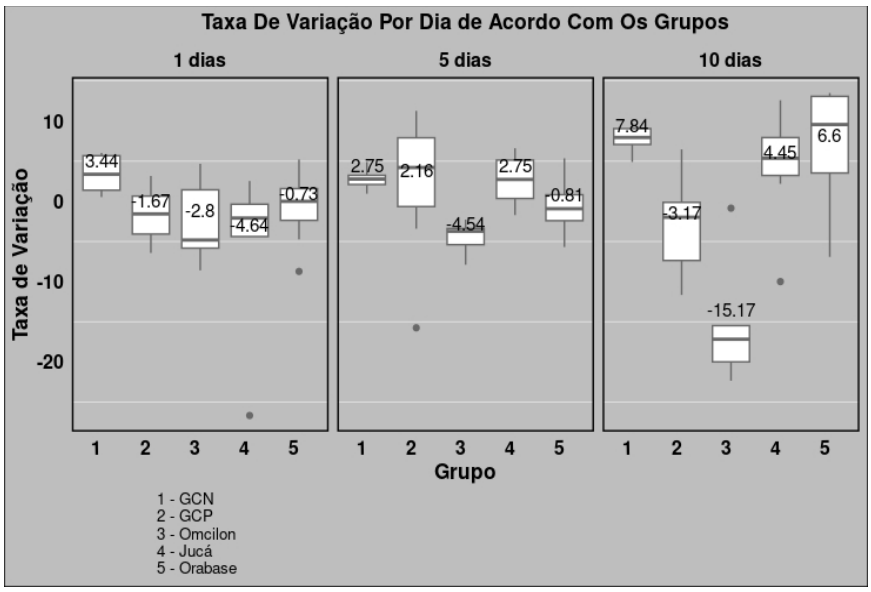


Figura 60. Taxa de Variação dos pesos, por período experimental, de acordo com os grupos.

Para comparar se houve diferença entre a massa final e a inicial dentro dos grupos, foi aplicado o teste pareado de Wilcoxon. A Tabela 10 demonstra diferença significativa de massa nos grupos G1 e G3 (Valor - p < 0,001 e Valor - p = 0,0020, respectivamente).

Tabela 10. Mudança de massa.

Grupos	Valor-p
1	< 0,001
2	0,6494
3	0,0020
4	0,1612
5	0,2304

Teste de Wilcoxon - Nivel de significancia de 5%.

Avaliando o peso corporal dos ratos observou-se que nos grupos experimentais G2 e G3 os ratos perderam peso em todos os dias de experimento, no grupo G4 no primeiro dia e no

grupo G5 nos dias 01 e 05. Observou-se também que o G1 apresentou ganho de peso em todos os períodos e o G4 nos dias 05 e 10. A perda de peso dos grupos experimentais pode estar relacionada com a persistência das células presentes no processo inflamatório que formam um tecido fibrótico exuberante gerando sintomatologia dolorosa, o que pode ocasionar a dificuldade na alimentação (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; BRIZENO *et al*., 2016; KRYCZKA & BONCELA, 2015).

Corroborando com esses relatos, estudos em modelos com mucosite oral relataram dores ocasionadas por lesões orais ulceradas, fator que pode levar o animal a limitar sua alimentação e sua hidratação oral, variante clínica que pode estar associada com o processo disfágico, corroborando também com resultados encontrados por Melo *et al.* (2022) em ratos normossistêmicos.

Outro fator relacionado a perda de massa corpórea pode ser explicado por modelos experimentais de indução diabética que demonstram resultados com as mesmas características clínicas apresentadas em seres humanos. Sem pormenorizar, os estudos apontaram uma perda de peso do animal diabético em relação a ratos normossistêmicos que varia entre 11 a 24%. (BRIZENO *et al*., 2016; KWON *et al*., 2008).

Leme *et al.* (2010) demonstraram em ratos no período de 24 horas após a utilização de aloxano, a redução de peso e alimentação indicando que os efeitos do aloxano manifesta-se em um curto período de tempo, pois este fármaco atua na produção de insulina para simular os mesmos processos clínicos e fisiológicos da diabetes em seres humanos, modulando o controle cerebral da fome e reduzindo a ingestão alimentar, corroborando com os achados neste estudo.

É importante notar que o grupo G3 ocorreu o menor ganho de peso em relação aos outros grupos, ao contrário, do grupo G1, G4 e G5 que houve o maior ganho de peso demonstrando que clinicamente a cicatrização ulcerativa com a formação de uma barreira física de proteção influenciou na capacidade de alimentação dos ratos normossistêmicos (G1) e os diabéticos tratados com a pomada de *Libidibia ferrea* L. (G4) e sem o princípio ativo (G5 – somente a orabase).

A pomada orabase além do princípio ativo que possui compostos farmacológicos que atuam na reparação de feridas, apresenta componentes oleosos fornecendo ação emoliente e melhor aderência à mucosa, sugerindo com os dados aqui apresentados o auxílio no processo regenerativo tecidual durante os tempos estudados, resultados estes, encontrados por Melo *et al.* (2022) quando tratados com uma formulação orabase de *Libidibia ferrea* L. e sem o princípio ativo.

5.3.3 Análise histopatológica

As tabelas 11 e figura 61 apresentam os resultados dos testes. Durante a análise histopatológica observou-se que não teve diferença significativa nos escores ulcerativos nos dias 01 e 05 em todos os grupos experimentais (figura 61). Entretanto, no dia 10 houve diferença significativa entre os grupos G1 e G5, não existindo esta diferença nos demais grupos.

Tabela 11. Teste de diferença - Escores ulcerativos.

	Tempo
Grupos	**Dia 10**
1	2,75 (± 0,46) A
2	3,00 (± 0,00) AB
3	3,00 (± 0,00) AB
4	3,25 (± 0,70) AB
5	3,62 (± 0,51) B
Valor - P	*0,02*

Média (± Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | *Nível de significância de 5%.*

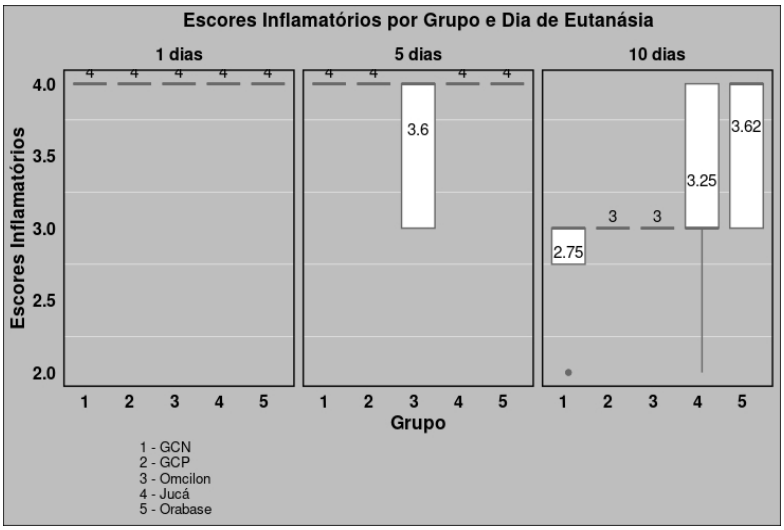


Figura 61. Resumo dos dados estatísticos - escores ulcerativos.

Segundo Koivisto *et al*. (2014) as lesões ulcerativas são comuns na cavidade bucal, seu processo de reparo de forma coordenada e progressiva culmina no restabelecimento da integridade e função da área lesionada, durante este processo regenerador há acontecimentos fisiopatológicos como coagulação sanguínea, inflamação, reepitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação e remodelação do tecido conjuntivo.

De acordo com os escores histológicos avaliados e a análise microscópica apresentada na figura 62 deste estudo, demonstraram a evolução do processo de reparação tecidual em todos os grupos experimentais. Contudo, os resultados confirmaram a progressão lenta da cicatrização da mucosa bucal dos animais diabéticos (G2) quando comparados ao grupo de ratos normossistêmicos (G1). Este retardo cicatricial pode ser caracterizado devido o aumento da fase inflamatória aguda, com acúmulo de células polimorfonucleares (PMN) e alteração da ativação de macrófagos, o que gera um atraso na formação do tecido de granulação e consequentemente na remodelação conjuntiva tecidual. Este aumento pode ser observado principalmente nos grupos avaliados no dia 05 do experimento, onde existiu maior concentração de células inflamatórias, onde o animal diabético (G2) apresentou histologicamente edema tecidual, hemorragia, danos celulares endoteliais, com baixa formação capilar, epitelial e incompleta remodelação da matriz extracelular.

Quando são comparados os grupos de ratos diabéticos (G3, G4 e G5) submetidos aos tratamentos experimentais propostos observou-se a evolução cicatricial, com neoformação de vasos sanguíneos dentro da matriz extracelular em formação; a angiogênese faz parte do processo de formação do tecido de granulação e é um processo fundamental para o reparo cicatricial. Entretanto, no grupo tratado com a pomada de *L. ferrea* L. (G4) observa-se um melhor reparo tecidual em relação aos outros grupos, neoformação de vasos sanguíneos, diminuição do processo inflamatório e melhor neoformação tecidual da matriz extracelular e epitelial.

No grupo tratado com a orabase (G5) observou-se também uma adequada neoformação tecidual e angiogênese, contudo a presença de infiltrado inflamatório misto caracteriza a presença de processo inflamatório. Estes resultados corroboram com estudo realizado por Melo *et al.* (2022) que ao comparar os grupos incluídos nos testes, evidenciaram a eficácia da formulação em orabase de *L. ferrea* L. proposta para cicatrização ulcerativa oral.

Os ratos com DM do grupo experimental G4, deste estudo, apresentaram processo cicatricial mais rápido e eficiente que os demais grupos, portanto, a utilização da pomada orabase de Jucá mostrou-se benéfica durante o tempo de tratamento proposto, favorecendo o reparo tecidual. Contudo, essa resposta também pode estar relacionada aos componentes da formulação, como observado no grupo G5, visto que a vaselina sólida e líquida tem ação emoliente e a *L. ferrea* L. atividade cicatrizante já comprovada em literatura (BRASIL, 2016; KOBAYASHI *et al.,* 2015; MELO *et al.* 2022; OLIVEIRA *et al*., 2010; SOARES *et al.,* 2013).

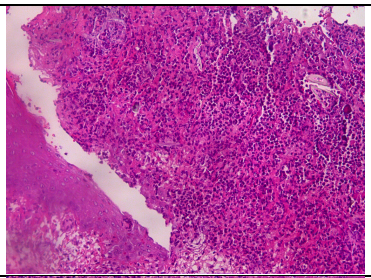
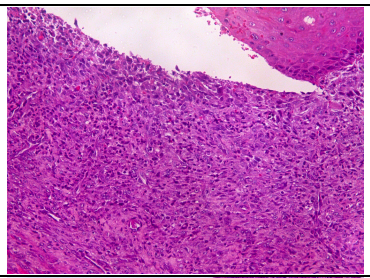
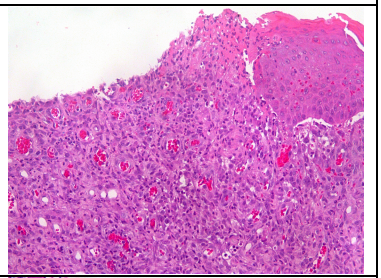
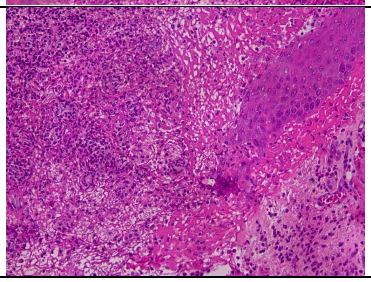
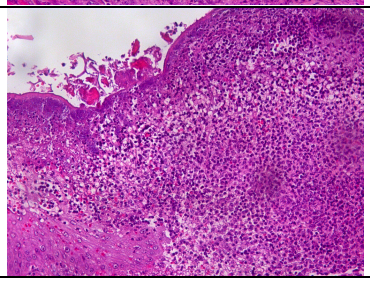
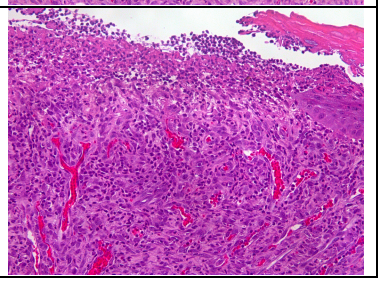
Ao demonstrar o retardo cicatricial em animais diabéticos Brizeno *et al.* (2016) e Rodrigues (2022) demonstraram resultados semelhantes ao presente estudo, onde foi verificado

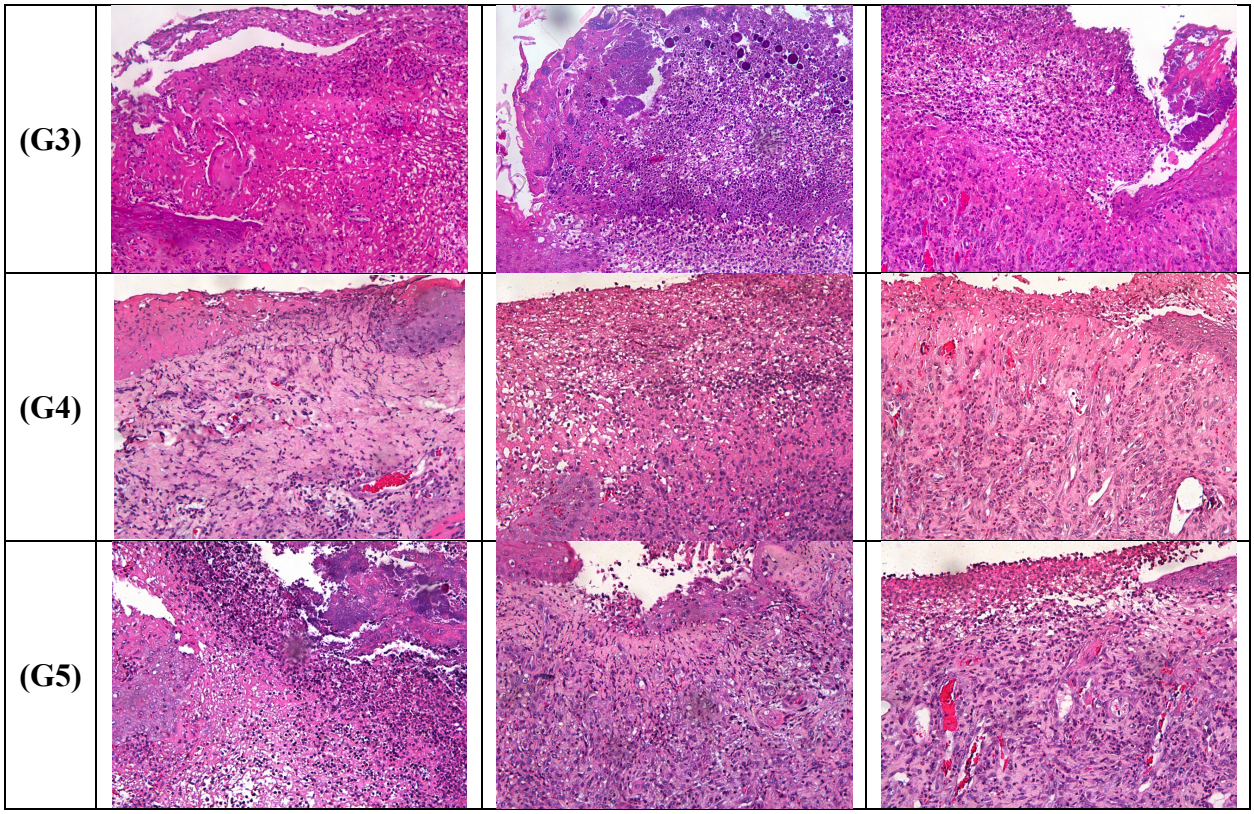
o retardo no processo de cicatrização dos animais diabéticos quando comparados com os normoglicêmicos. Nesses estudos, os grupos dos animais diabéticos não apresentaram reepitelização completa com pouco neoformação de vasos sanguíneos, edema tecidual, hemorragia, danos endoteliais sem completa formação dos tecidos da matriz extracelular e epiteliais, corroborando com os achados histológicos deste experimento.

Infere-se que a pomada orabase de *L. ferrea* L. demonstra um adequado controle do processo inflamatório e reparador mesmo em animais diabéticos que apresentam o retardo cicatricial já comprovados em diversos estudos. Em 10 dias, nenhum grupo demonstrou total reepitelização e reparo tecidual, porém no G4 observou-se boa remodelação da nova matriz celular, diminuição do infiltrado inflamatório misto, com poucos vasos ectásicos e presença de neoformação de vasos sanguíneos.

Comparando os resultados histopatológicos de Melo *et al.* (2022) utilizando uma formulação orabase de *L. ferrea* L. em ratos normoglicêmicos com ratos diabéticos deste estudo no mesmo tempo experimental, observou-se que os ratos normoglicêmicos do grupo Jucá apresentaram o recobrimento epitelial completo, com excelente reparação tecidual. Já nos ratos diabéticos evidenciou-se o retardo cicatricial, porém mesmo com o retardo de cicatrização esperado devido à diabetes, o grupo da formulação orabase de *L. ferrea* L. apresentou os melhores resultados, evidenciando a indicação clínica da formulação testada.

Figura 62. Análise histopatológica dos grupos experimentais, de acordo com os escores histológicos (200x).

	Dia 1	**Dia 5**	**Dia 10**
(G1)			
(G2)			



5.3.4 Análise da colagênese (colágeno total, colágeno tipo I, colágeno tipo III)

A tabela 12 e figura 63 demonstram os resultados da avaliação do colágeno total.

Na comparação entre os grupos nos dias 01, 05 e 10 não houve diferença significativa entre os grupos. Na comparação intragrupos, é visto que no grupo G5, apenas no dia 10 há diferença significativa do colágeno total com os demais dias. Nos grupos G1 e G3 os dias 01 e 10 possuem diferença significativa entre si. O grupo G4 apresentou diferença significativa nos dias 01, 05 e 10 entre si.

Tabela 12. Análise do Colágeno Total nos grupos experimentais.

	Tempo			
Grupos	**Dia 01**	**Dia 05**	**Dia 10**	**Valor-P**
1	4,91 (± 4,23) Ab	12,59 (± 7,16) Aab	22,11 (± 8,21)Aa	0,0054
2	8,36 (± 5,73) Aa	6,69 (± 1,61) Aa	14,91 (±11,59)Aa	0,6154
3	4,87 (± 1,95) Ab	9,24 (± 2,17) Aab	17,11 (± 7,92)Aa	0,0125
4	5,38 (± 3,72) Ac	12,17 (± 2,81) Ab	19,77 (± 3,03)Aa	0,0002
5	7,28 (± 5,99) Ab	9,61 (± 3,21) Ab	15,27 (± 3,09)Aa	0,0151
Valor - P	*0,6536*	*0,1169*	*0,0943*	

Média (±Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas comparação intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%.*

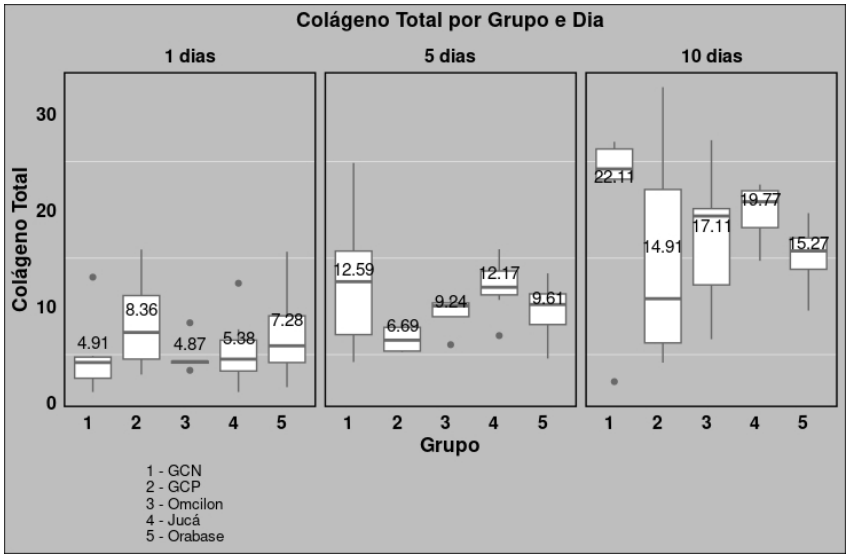


Figura 63. Variação do Colágeno Total, por período expermental, de acordo com os grupos.

A tabela 13 e figura 64 demonstram os resultados da avaliação do colágeno tipo I. Na comparação entre os grupos nos dias 01, 05 e 10 não houve diferença significativa entre os grupos. Na comparação intragrupos, é visto que nos grupos G1 e G3, apenas no dia 1 há diferença significativa do colágeno I com os demais dias. Nos grupos G2 e G5, os dias 01, 05 e 10 não possuem diferença significativa entre si em relação ao colágeno I. O grupo G4 apresentou diferença significativa nos dias 01, 05 e 10 entre si.

Tabela 13. Análise do Colágeno I nos grupos experimentais.

	Tempo			
Grupos	**Dia 01**	**Dia 05**	**Dia 10**	**Valor-P**
1	3,18 (± 2,39) Ab	10,53(± 5,48) Aa	14,80 (± 5,86) Aa	0,0061
2	5,23 (± 4,71) Aa	5,51 (± 1,53) Aa	9,89 (± 8,09) Aa	0,3428
3	4,06 (± 1,80) Ab	7,38 (± 2,08) Aab	13,48 (± 7,32) Aa	0,0257
4	4,33 (± 2,91) Ac	9,33 (± 2,25) Ab	13,91 (± 2,07) Aa	0,0002
5	6,49 (± 5,40) Aa	8,06 (± 3,27) Aa	11,21 (± 2,45)Aa	0,1209
Valor - P	*0,7210*	*0,1500*	*0,2453*	

Média (± Desvio Padrão) |Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas comparação intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%.*

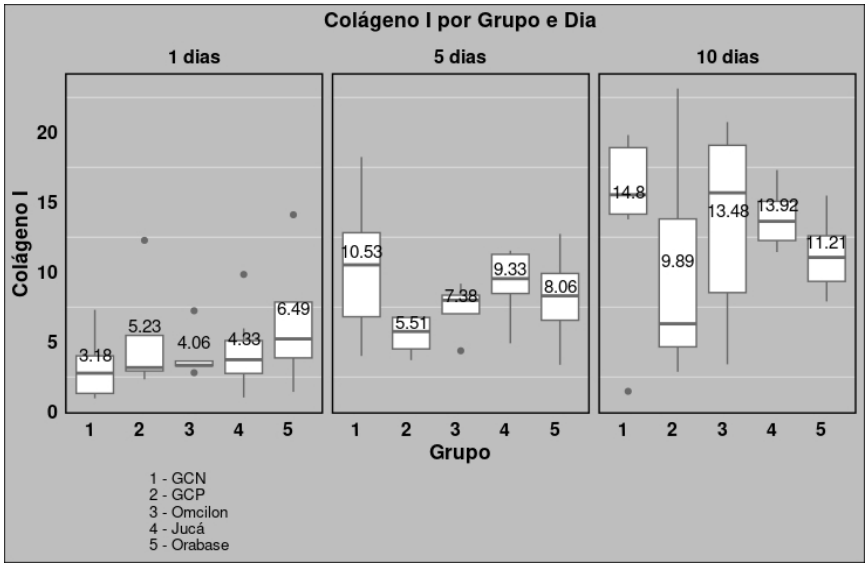


Figura 64. Variação do Colágeno I, por período experimental, de acordo com os grupos.

Por fim, evidencia-se os resultados da análise do colágeno tipo III na tabela 14 e figura 65. Na comparação entre os grupos nos dias 01, 05 e 10 não houve diferença significativa entre os grupos. Na comparação intragrupos, é visto que nos grupos G1 e G5, apenas no dia 10 há diferença significativa do colágeno III com os demais dias. No grupo G2 não há diferença significativa do colágeno III em relação aos dias. No grupo G3 o dia 01 difere dos demais dias. O grupo G4 apresentou diferença significativa nos dias 01, 05 e 10 entre si. No grupo G5, apenas o dia 10 difere dos demais.

Tabela 14. Análise do Colágeno III nos grupos experimentais.

	Tempo			
Grupos	**Dia 1**	**Dia 5**	**Dia 10**	**Valor-P**
1	1,73 (± 2,08) Ab	2,06 (± 2,17) Ab	7,31 (± 3,04) Aa	0,0069
2	3,12 (± 2,47) Aa	1,19 (± 0,64) Aa	5,02 (± 3,81) Aa	0,2043
3	0,81 (± 0,21) Ab	1,87 (± 0,30) Aa	3,63 (± 1,94) Aa	0,0085
4	1,05 (± 0,84) Ac	2,84 (± 1,12) Ab	5,85 (± 1,68) Aa	0,0003
5	0,79 (± 0,63) Aab	1,55 (± 0,56) Ab	4,06 (± 1,97) Aa	0,0023
Valor P	*0,4124*	*0,0914*	*0,0700*	

Média (± Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%.*

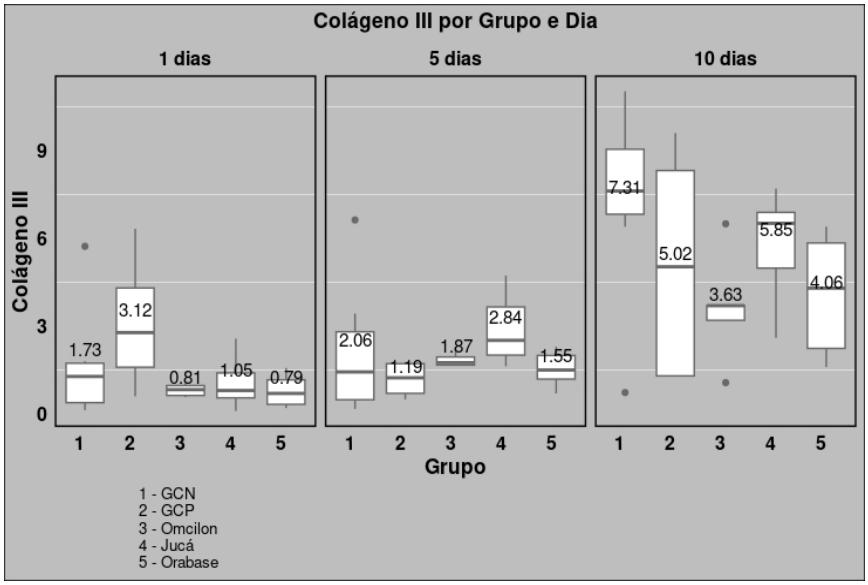


Figura 65. Variação do Colágeno III, por período experimental, de acordo com os grupos.

Os fibroblastos são células responsáveis pela formação de colágeno e proteínas da matriz extracelular, sendo de relevante importância para a contração da ferida e consequente reparo tecidual. Pode-se observar que mesmo sem diferença estatística significativa entre os grupos testados, o G1 e G4 apresentaram os melhores resultados para atividade de colágeno total, tipo I e tipo III depois dos 10 dias de experimento, demonstrando a maior produção em relação aos outros grupos, o que corrobora com os achados da análise histopatológica que demonstra melhor neoformação tecidual nestes grupos (G1 e G4).

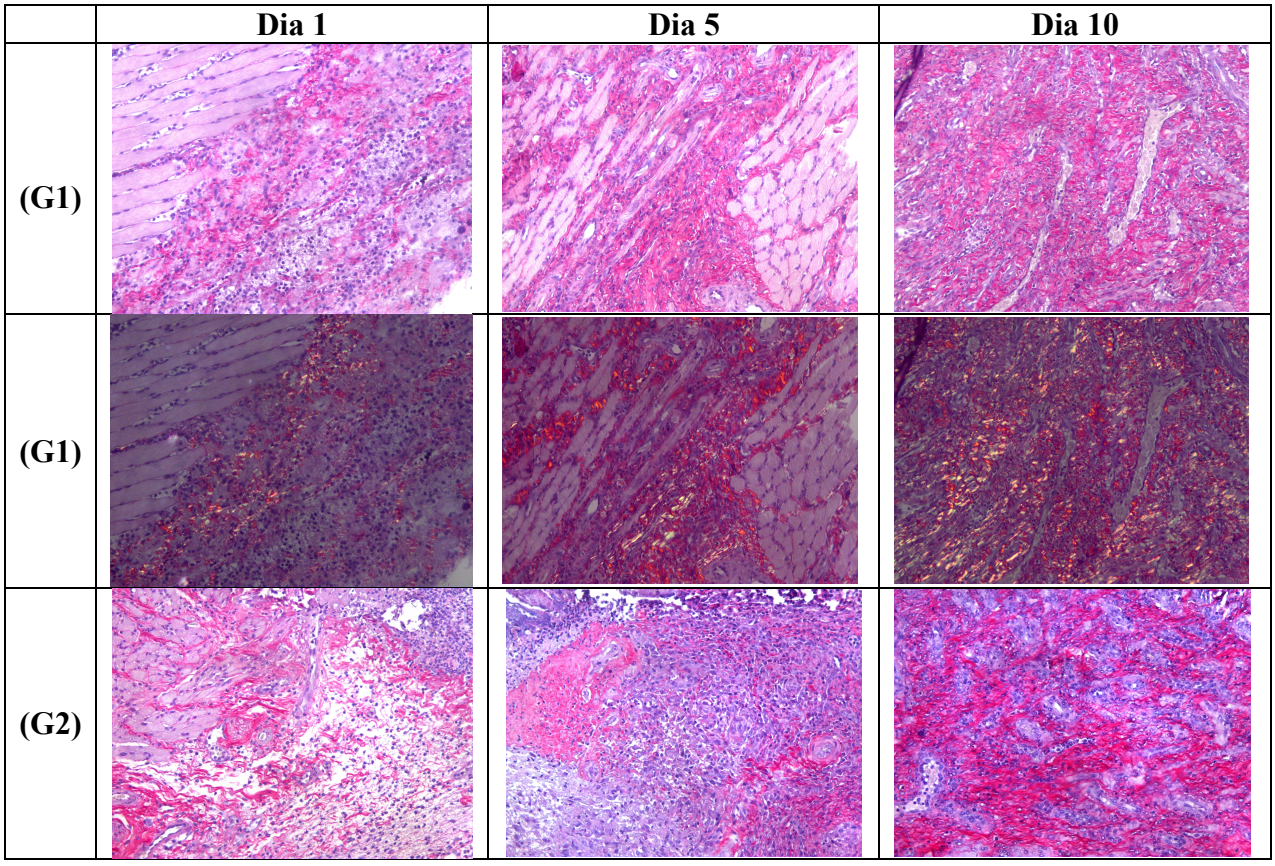
Achados semelhantes também foram encontrados por Rodrigues (2002) e Brizeno *et al*. (2016) evidenciando a redução de fibroplasia e diminuição da deposição colagênica dos ratos diabéticos em relação aos normoglicêmicos, muitos estudos ratificam diversas alterações celulares relacionadas ao DM culminando na redução dos fibroblastos na MEC (BRIZENO *et al.*, 2016; DESTA *et al*., 2010; LIU *et al*., 2004; MIAO *et al*., 2012; RODRIGUES, 2022).

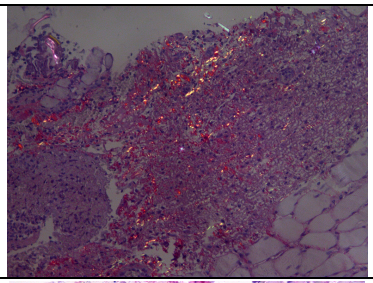
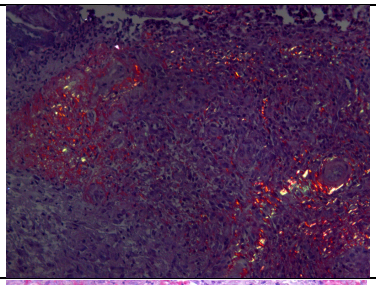
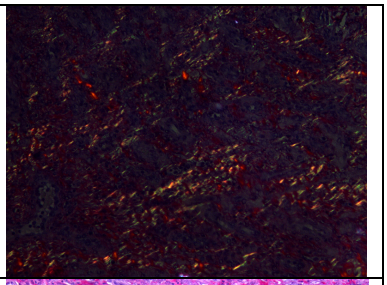
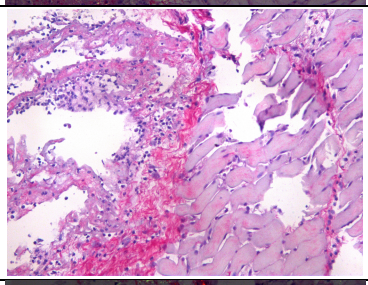
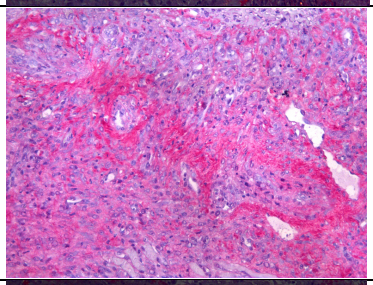
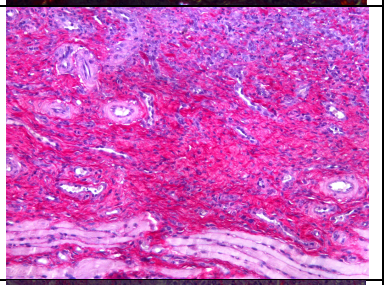
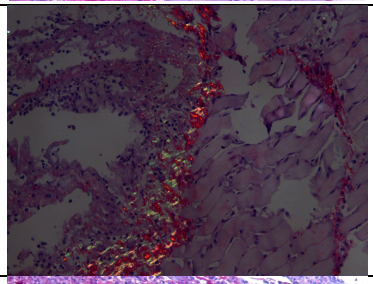
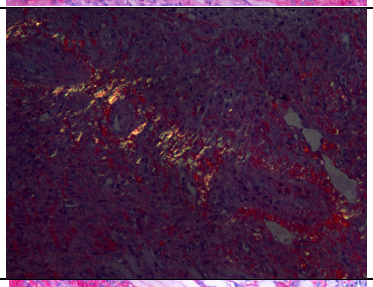
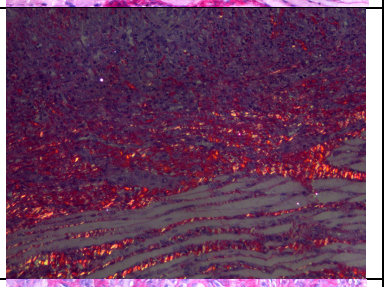
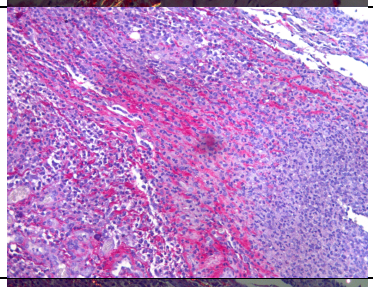
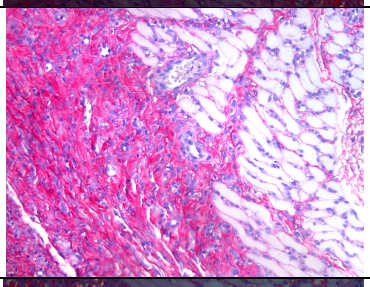
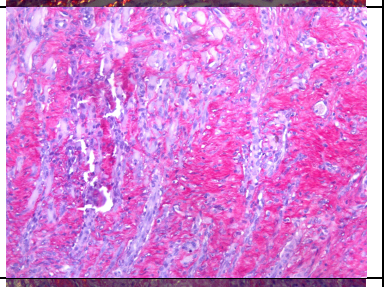
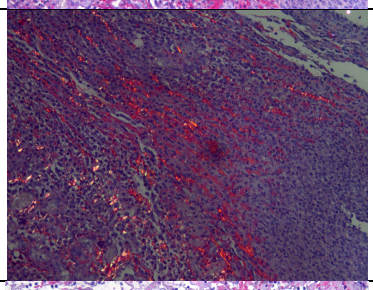
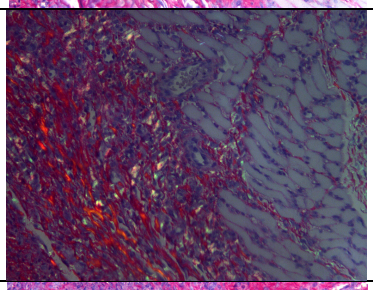
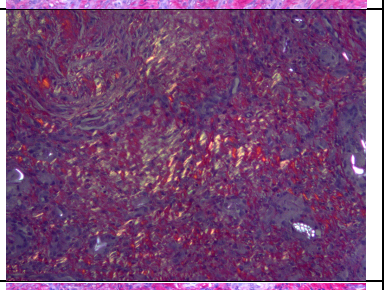
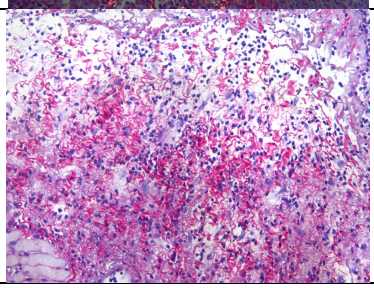
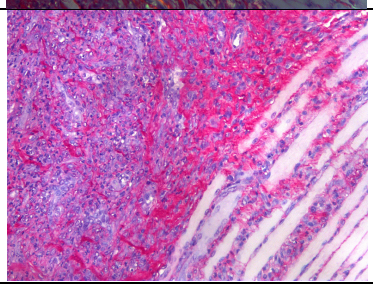
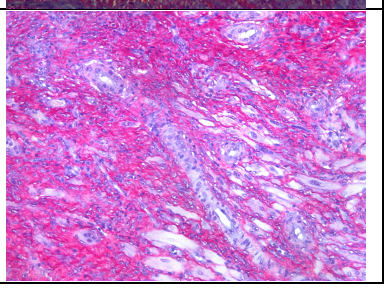
Muitas colorações podem ser empregadas para a visualização da deposição colagênica, apesar disso a maioria é inespecífica sendo insuficiente para demonstrar estruturas mais delgadas. A técnica do "Picrosirius Red" é descrita como a mais adequada para tipificar e evidenciar o colágeno, além da vantagem de poder avaliar em microscópio o padrão de disposição das fibras e sua arquitetura tecidual (MONTES; JUNQUEIRA, 1991; BRIZENO *et al.*, 2016; RODRIGUES, 2022). Após a realização da análise de Picrosirius Red observa-se na figura 66 a menor deposição de colágeno nos animais diabéticos (G2) quando comparados aos ratos normoglicêmicos (G1); dentre os grupos G3, G4 e G5 podemos observar a deposição

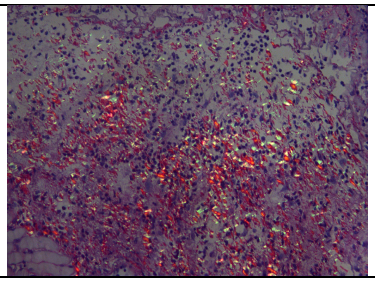
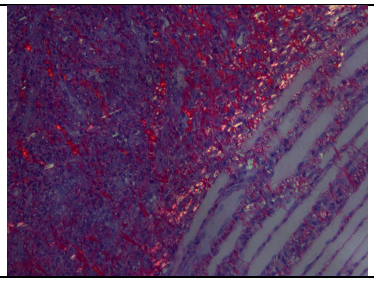
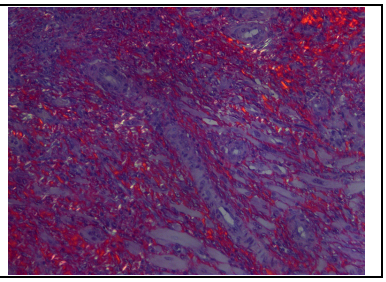
colagênica em todos os grupos, observando a maior deposição no grupo G4, durante os tempos experimentais de estudos.

Estudos evidenciam diversas alterações nos fibroblastos relacionados ao DM, como defeitos na diferenciação, proliferação e aumento da apoptose e consequente redução da quantidade celular (CARVALHO *et al*., 2010; DESTA *et al*., 2010; LIU *et al*., 2010). Além disso, os fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos sob a influência de TGF-β, sendo de extrema importância para contração e reparação tecidual. Kwon *et al*., (2008) mostraram através de um estudo com células estromais que essas elevam os fatores de crescimento teciduais promovendo um aumento do recrutamento e proliferação de fibroblastos para deposição de colágeno, contudo no diabético, além de evidenciar uma superexpressão de TNF-α há uma subexpressão dos fatores de crescimento (principalmente TGF-β), promovendo a apoptose dos fibroblastos e menor colagênese promovendo o déficit cicatricial, corroborando com os achados do presente estudo.

Figura 66. Análise da atividade de colagênese dos grupos experimentais (aumento 400x).



(G2)			
(G3)			
(G3)			
(G4)			
(G4)			
(G5)			

(G5)			

5.3.5 Reação imunohistoquímica para IL-1, TNF-α, TGF-β e CD31

Para o estudo do conjunto denominado Imunohistoquímica foram analisadas as variáveis IL-1, TNF-α, TGF-β e CD31. Onde, IL-1 e TNF-α apresentaram dados para os dias 01 e 05, e TGF-β e CD31 apresentaram dados para os dias 05 e 10.

A tabela 15 e figura 67 apresentam os resultados dos testes. Na comparação entre os grupos, é visto que no dia 01, o grupo G1 difere dos grupos G4 e G5, mas não difere dos grupos G2 e G3. Os grupos G4 e G5 não diferem dos grupos G2 e G3. Em relação ao dia 05 não há diferença significativa entre os grupos.

No presente estudo observou-se que apesar da avaliação clínica não ter apresentado diferenças significativas em alguns parâmetros, demonstrou a redução da área ulcerativa em todos os grupos testados, principalmente nos grupos G1 e G3. Essa evolução foi associada ao aumento da colagênese e redução do infiltrado inflamatório e da permeabilidade vascular. Contudo, a análise imunohistoquímica demonstrou um retardo da cicatrização associado a elevados níveis de IL-1, principalmente no grupo G3, o que pode indicar o ápice do processo inflamatório no dia 05, porém observa-se a redução dos níveis de IL-1 nos grupos G1 e G2, mesmo sem diferença estatística significativa. A circulação de TNF-α pode estimular a liberação de interleucinas (ILS) de macrófagos, células endoteliais e queratinócitos, que por sua vez ativam células T e induzem o crescimento e diferenciação de células T citotóxicas, levando à destruição de células epiteliais e formação de úlceras (DESTA *et al*., 2010; LIU *et al*., 2010; MESQUITA *et al*., 2020).

Em um estudo clínico randomizado realizado por Elamrousy *et al*. (2021) avaliou-se um gel para tratamento de estomatite aftosa recorrente (RAS) analisando os níveis séricos de IL-1, TNF-α e IL-8 um dia antes da aplicação do gel e 7 dias após a cicatrização completa da úlcera. Os resultados encontrados produziram níveis séricos significativamente reduzidos de IL-1, TNF-α e IL-8 após a aplicação do gel em ambos os grupos, contudo com melhora significativa no grupo teste em relação ao placebo do grupo controle. Esta melhoria significativa no grupo de estudo pode ser atribuída aos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes

do CWP. Em conclusão, este ensaio clínico concluiu que o gel CWP facilitou com sucesso a cura do RAS, reduziu a cura período, e regulou os marcadores inflamatórios. Os resultados desse estudo estão de acordo com Ebaid *et al.* (2015) que avaliaram o suplemento dietético de CWP na regulação dos níveis séricos de TNF-α, IL-1β e IL-6, na peroxidação lipídica hepática e no sistema de defesa antioxidante; os resultados revelaram uma queda significativa de biomarcadores séricos, peroxidação lipídica hepática e ERO com aumento significativo da atividade antioxidante celular em ratos diabéticos feridos.

Já Mesquita *et al*. (2020) demonstraram resultados semelhantes a este estudo ao avaliar a influência do tratamento com Abatacept no reparo de úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos onde a análise histológica demonstrou que o grupo tratado com a maior dose mostrou retardo da cicatrização associado a elevados níveis de IL-1β, IL-6 e iNOS; concluindo que o tratamento com Abatacept reduziu o diâmetro da úlcera, a migração de células inflamatórias, a relação CD8+/CD30+ e a permeabilidade vascular e aumentou a colagênese e a expressão de IL-10 no início do protocolo. Porém, na maior dose (ABA 20), houve retardo do reparo, redução do número de vasos e prolongamento da expressão de iNOS, IL-1β e IL-6.

Apesar da avaliação de IL-1 ter indicado o processo inflamatório exacerbado, principalmente no dia 05, podemos observar na figura 68 que dentre os grupos experimentais o G4 apresentou menor marcação celular no dia 01 e no dia 05 sem diferenças significativas entre os grupos, sugerindo que a IL-1 é o mediador que dispara o processo inflamatório no presente estudo.

Tabela 15. Análise da IL-1 nos grupos experimentais.

	Tempo		
Grupos	**Dia 01**	**Dia 05**	**Valor-P**
G1	710,17 (± 82,66) Aa	696,83 (± 140,07) Aa	*0,7488*
G2	585,33 (± 175,89) ABa	707,75 (± 161,52) Aa	*0,3938*
G3	639,17 (± 141,90) ABa	741,20 (± 113,57) Aa	*0,2733*
G4	479,67 (± 147,91) Ba	612,00 (± 131,58) Aa	*0,1495*
G5	466,83 (± 80,78) Ba	603,17 (± 127,69) Aa	*0,0542*
Valor P	*0,0162*	*0,4235*	

Média (± Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%.*

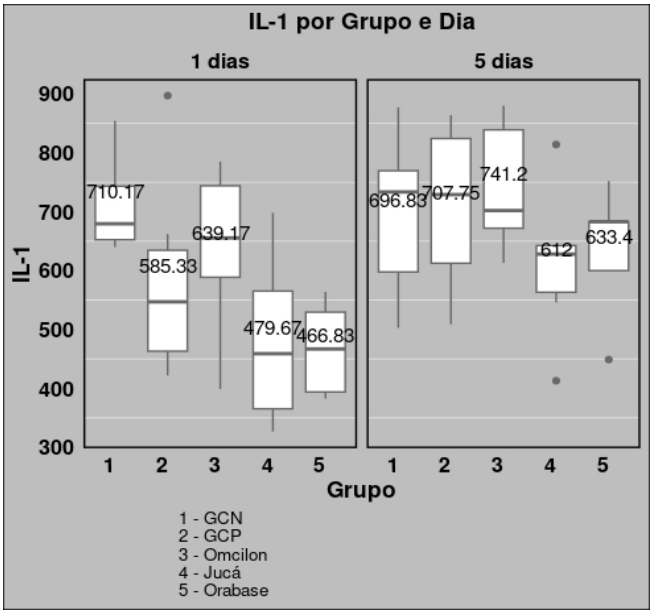
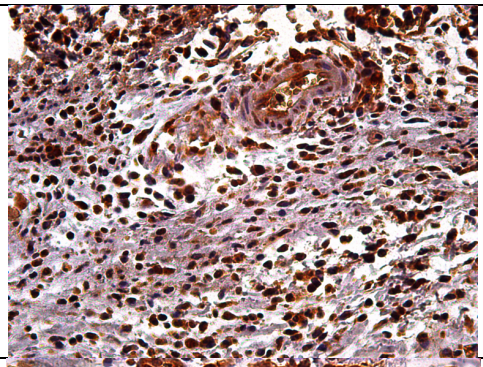
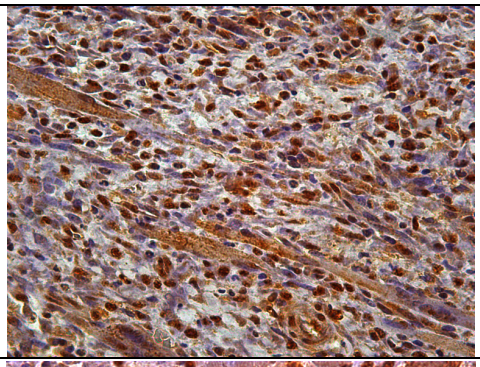
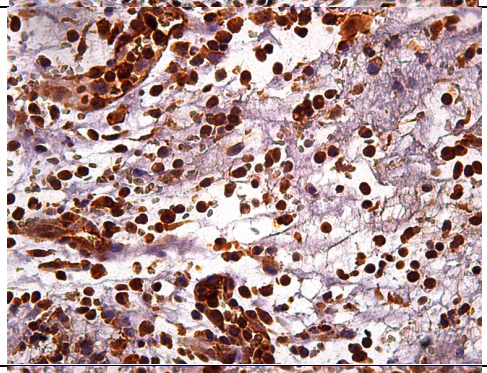
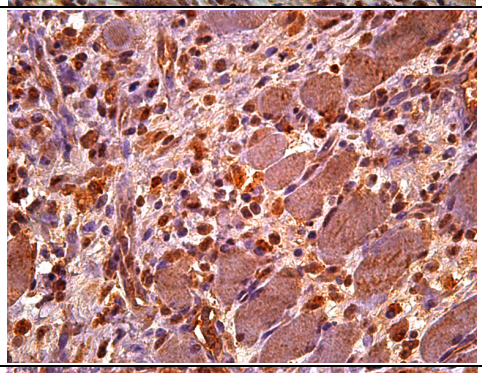
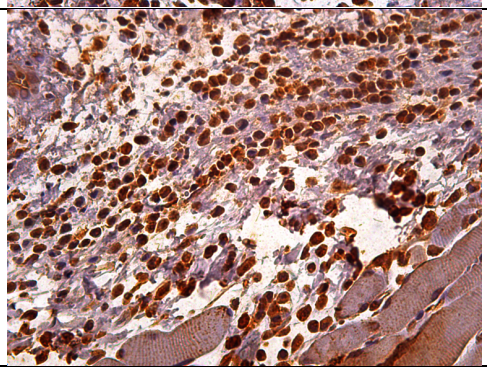
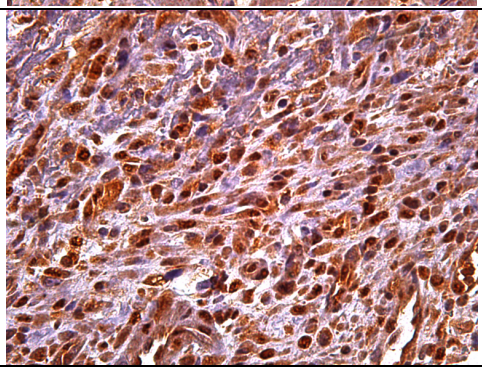
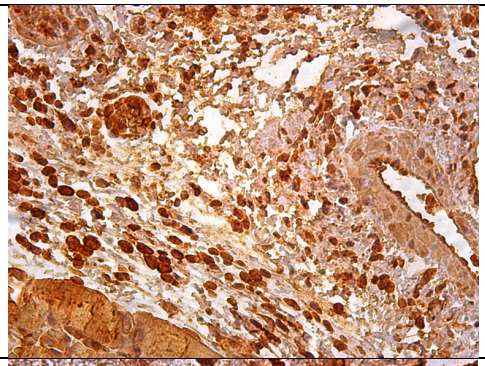
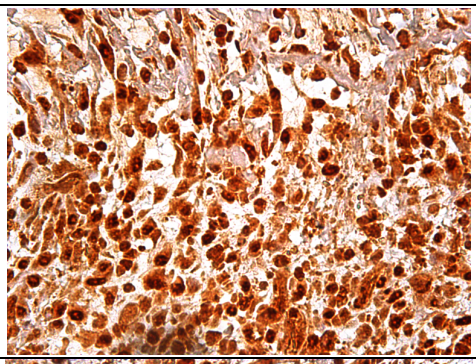
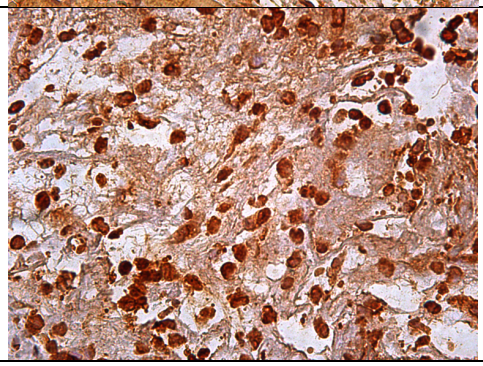
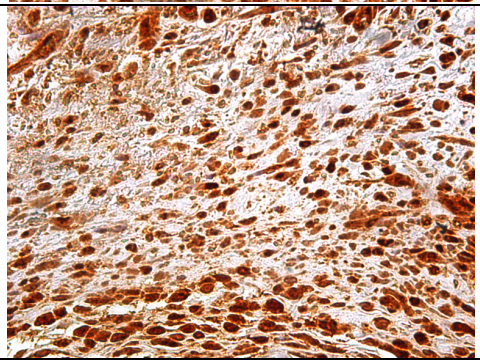


Figura 67 - Variação do IL-1, por período experimental, de acordo com os grupos.

Figura 68. IL-1 – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais (aumento 400x).

	Dia 1	**Dia 5**
(G1)		
(G2)		
(G3)		

(G4)		
(G5)		

A tabela 16 e figura 69 demonstram os resultados dos testes para avaliação de TNF-α. Na comparação entre os grupos, é visto que no dia 01, o grupo 1 difere somente do grupo 2. Em relação ao dia 05 não há diferença significativa entre os grupos. Na comparação intragrupos, os grupos 1, e 3 não possuem diferença em relação aos dias. Os grupos 2, 4 e 5 diferem em relação aos dias 01 e 05.

Tabela 16. Análise do TNF-α nos grupos experimentais.

	Tempo		
Grupos	**Dia 01**	**Dia 05**	**Valor-P**
1	17,17 (± 11,77) Ba	11,33 (± 11,48) Aa	0,4209
2	69,50 (± 37,10) Aa	19,60 (± 17,13) Ab	0,0281
3	51,50 (± 53,51) ABa	50,20 (± 64,20) Aa	0,7150
4	68,83 (± 39,82) ABa	21,60 (± 31,82) Ab	0,0441
5	44,67 (± 12,13) ABa	7,40 (± 7,89) Ab	0,0061
Valor - P	*0,0366*	*0,4278*	

Média (± Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%.*

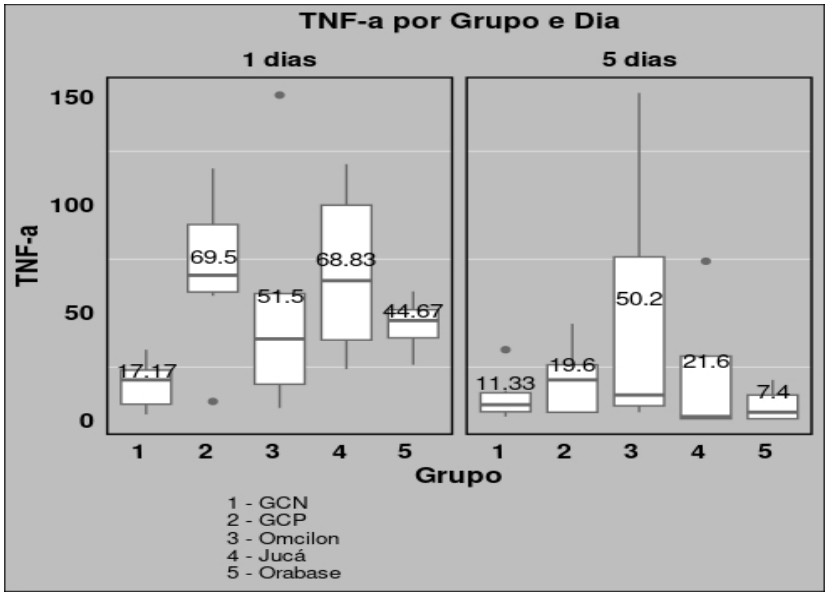
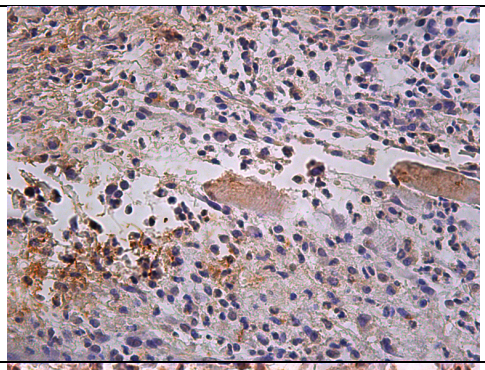
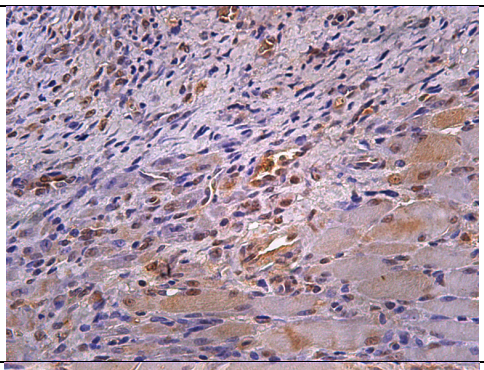
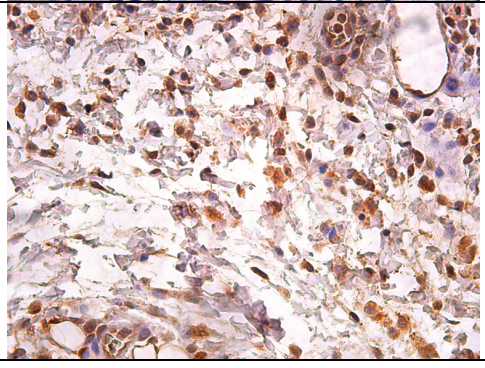
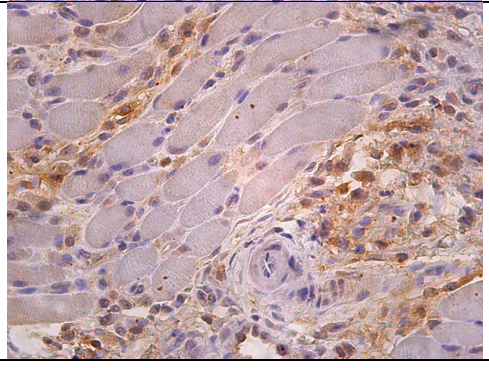
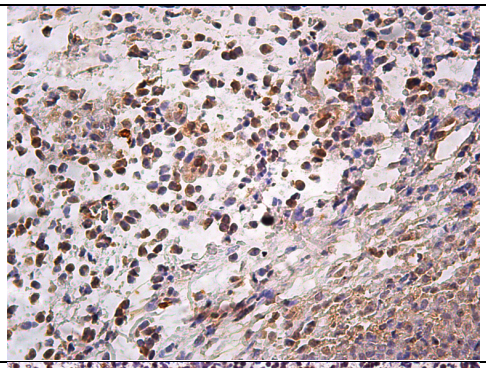
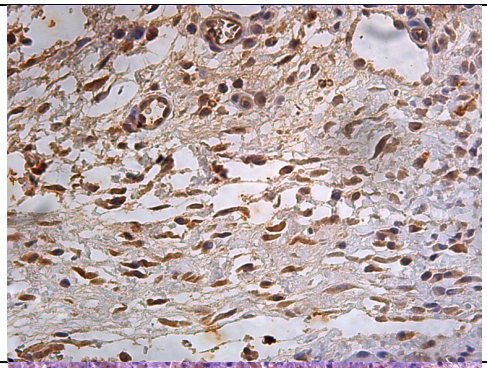
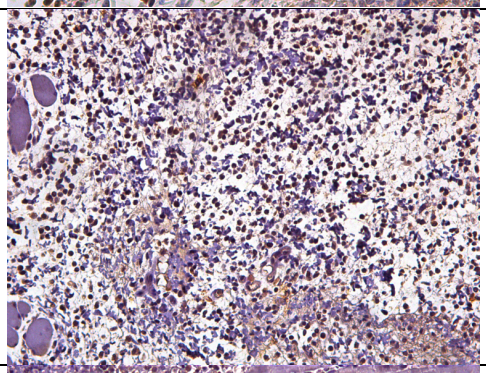
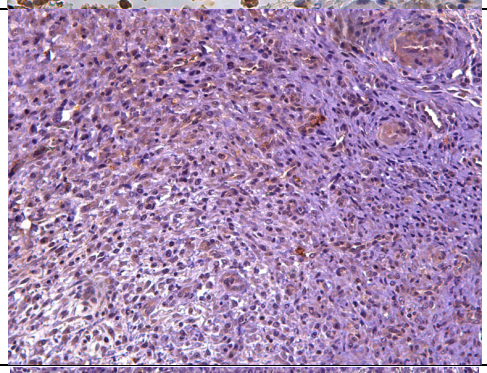
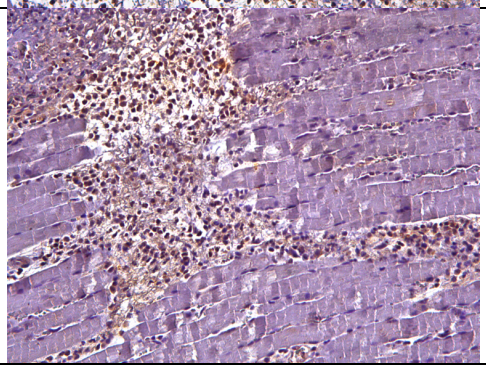
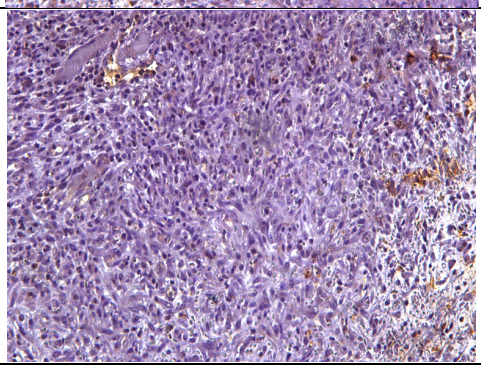


Figura 69. Variação do TNF-α, por período experimental, de acordo com os grupos.

Na figura 70 observa-se também que os resultados histopatológicos demonstram a progressão mais lenta da cicatrização dos animais diabéticos em relação aos animais normoglicêmicos, o que pode ser justificado por um prolongamento da fase inflamatória aguda. Apesar disso, observa-se a diminuição do TNF-α em todos os grupos experimentais, excetuando o grupo G1 e G3, nos quais que não houve mudanças significativas.

Figura 70. TNF-α – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais (aumento 400x).

	Dia 1	**Dia 5**
(G1)		
(G2)		

(G3)		
(G4)		
(G5)		

Inúmeros fatores têm sido apontados como responsáveis pelo déficit cicatricial observados nos parâmetros histológicos de animais diabéticos, dentre eles: exacerbação do processo inflamatório com o acúmulo de polimorfonucleares (PMN); atraso na migração de monócitos para o local da injúria, bem como alteração da ativação dos macrófagos os quais são responsáveis pela liberação de citocinas inflamatórias como o TNF-α (MIAO *et al.,* 2012).

Kwon *et al*. (2008) mostraram que o tratamento com células estromais derivadas da medula óssea promovem uma melhora cicatricial no animal diabético. A evolução do processo cicatricial estava relacionada ao fato das células estromais poderem se diferenciar em vários tipos celulares, consequentemente aumentando a expressão de fatores de crescimento, promovendo o recrutamento e proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno. No DM, além de evidenciar uma superexpressão de TNF-α, encontra-se também uma subexpressão de fatores de crescimento culminando em uma menor diferenciação, proliferação e maior apoptose dos fibroblastos e menor colagênese promovendo o déficit cicatricial. No presente estudo

observa-se pouca quantidade de células marcadas contudo a maior quantidade encontra-se presente nos grupos diabéticos, tendo uma diminuição significativa no grupo G2, G4 e G5.

A Tabela 17 e a figura 71 demostram os resultados da avaliação do fator de crescimento TGF-β. Na comparação entre os grupos, observou-se que para o dia 05, apesar de o teste de Kruskal-Wallis detectar que pelo menos um dos grupos difere dos demais, no teste de Dunn não foram obtidos diferenças significativas. Outros testes foram realizados para contornar a situação, mas nenhum se mostrou eficaz para detectar a diferença. Em relação ao dia 10, os grupos G1, G4 e G5, não diferem entre si, mas diferem dos demais grupos. Na comparação intragrupos, os grupos 1 e 5 não possuem diferença em relação aos dias. Os grupos G2, G3 e G4 diferem em relação aos dias 05 e 10.

Tabela 17. Análise do TGF-β nos grupos experimentais.

	Tempo		
Grupos	**Dia 5***	**Dia 10**	**Valor-P**
1	13,83 (± 10,98) Aa	19,40 (± 17,31) Ca	0,6473
2	6,80 (± 3,70) Ab	181,67 (± 78,10) Aa	0,0062
3	28,60 (± 16,13) Ab	119,20 (± 73,58) ABa	0,0465
4	8,67 (± 9,40) Ab	29,20 (± 11,39) BCa	0,0166
5	20,25 (± 1,50) Aa	16,75 (± 10,00) Ca	0,2454
Valor-P	*0,0480*	*0,0019*	

Média (± Desvio Padrão) | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas comparação intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%. * Não houve diferença significativa no Teste de Dunn.*

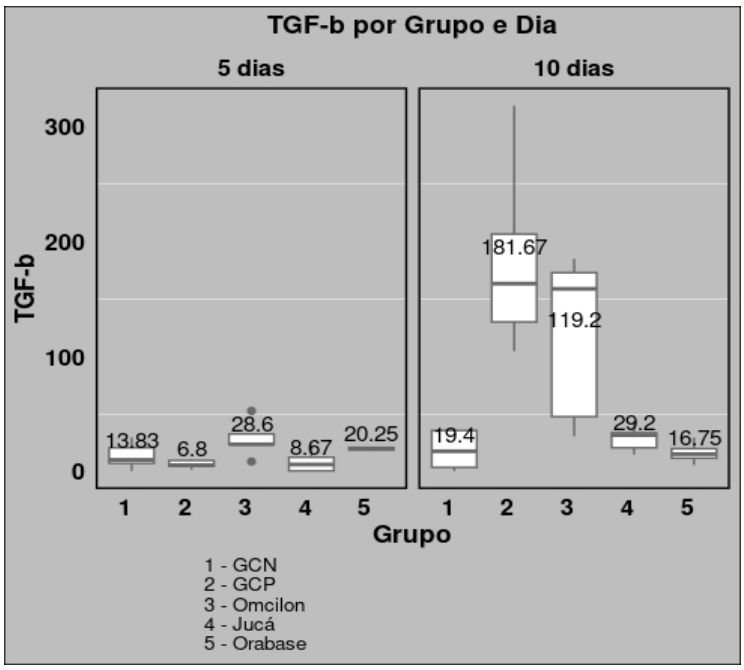


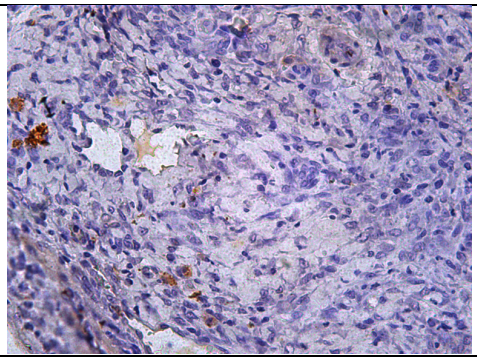
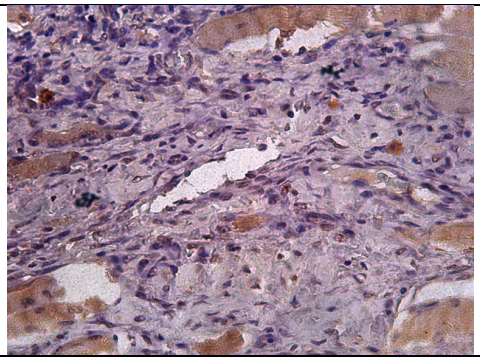
Figura 71. Variação do TGF-β, por período experimental, de acordo com os grupos.

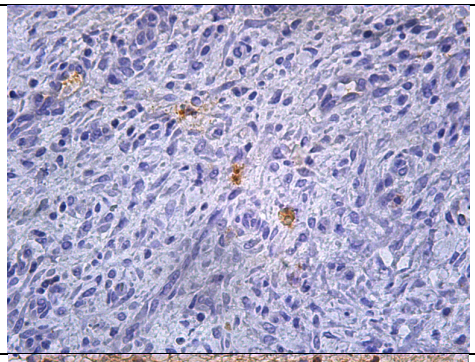
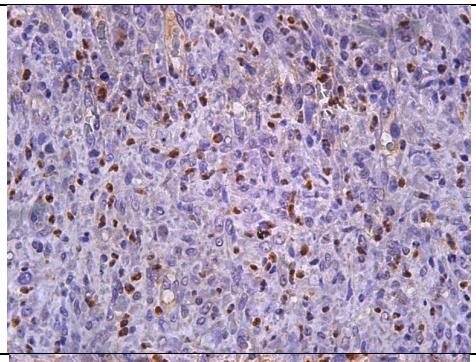
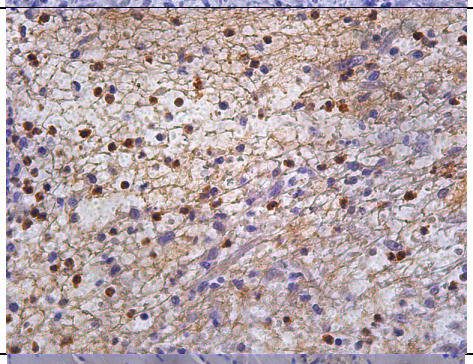
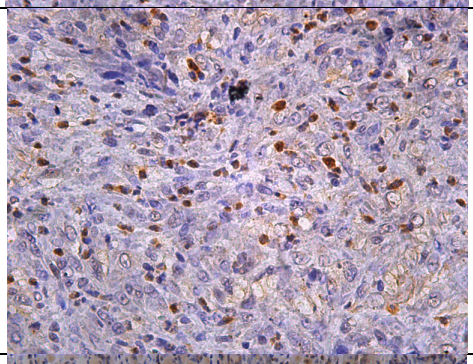
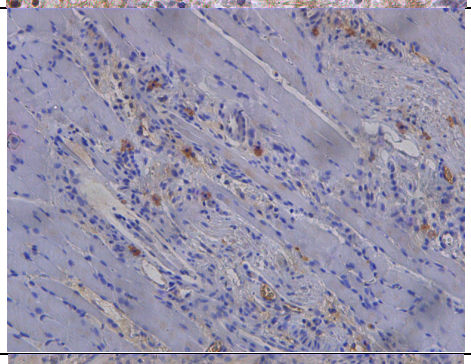
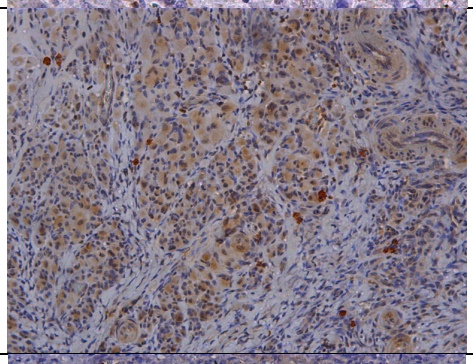
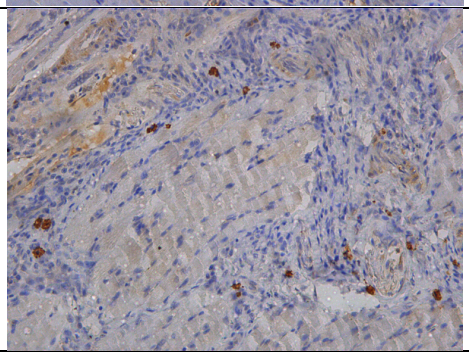
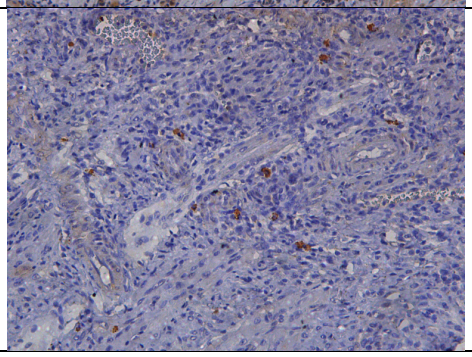
Os macrófagos ativados são uma das principais células responsáveis pela migração de fibroblastos e expressão de fatores pro-fibróticos na área da lesão. Porém, para que ocorra esta expressão é necessário que o macrófago saia do fenótipo anti-inflamatório para o pró-reparativo, transformando-se em M2; são os macrófagos M2 que participam ativamente do processo de reparação tecidual liberando fatores de crescimento como TGF-β que é fundamental para migração de fibroblastos para o local da lesão, e o principal responsável pela expressão de colágeno, de modo que a deficiência desse fator interfere diretamente na colagênese e consequente cicatrização tecidual (LI *et al*., 2019; SMIGIEL; PARKS, 2018).

É possível observar no dia 05 que todos os grupos tiveram um aumento de TGF-β, com exceção do grupo G5. Nota-se ainda um aumento significativo nos grupos G2, G3 e G4 no dia 10. Na figura 72, observa-se no dia 05 que por apresentar processo inflamatório exacerbado exibe-se poucas células marcadas, sugerindo que a IL-1 ainda presente no 5 dia é extremamente pró-inflamatória, diminuindo a quantidade de TGF-β e a consequente conversão de fibroblastos em miofibroblastos para a produção de colágeno.

Um estudo feito por Rodrigues (2022) em úlceras orais de ratos diabéticos mostrou uma diminuição significativa em alguns grupos de estudo de TGF-β a partir do 3° dia de experimento e a partir do 7° dia mantiveram os mesmos níveis, o que corrobora com os dados achados neste presente estudo no dia 05, achados semelhantes foram encontrados por Li *et al*. (2019) onde observaram que a inibição de TLR4 influenciou negativamente a expressão de TGF-β em modelo de cicatriz hipertrófica em camundongos.

Figura 72. TGF-β – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais (aumento 400x).

	Dia 5	**Dia 10**
(G1)		

(G2)		
(G3)		
(G4)		
(G5)		

Para finalizar a avaliação dos mediadores inflamatórios e fatores de crescimento a Tabela 18 e a figura 73 apresentam os resultados do CD31. Na comparação entre os grupos, é visto que no dia 05 há diferença significativa no CD31 apenas entre o grupo G1 e o grupo G5 Em relação ao dia 10 não há diferença entre os grupos G1, G2 e G3, assim como não há diferença entre o grupo G4 e G2 e não há diferença entre os G5 e G4. Na comparação intragrupos, não há diferença significativa no CD31 dos grupos em relação aos dias.

Observa-se na tabela 25 que nenhum dos grupos apresentou diferenças estatísticas entre o dia 05 e o dia 10, contudo no dia 05 e no dia 10 os grupos que mais expressaram CD31 foram

o G4 e G5. Entretanto, o aumento da densidade vascular, neste estudo, não parece associar-se a um benefício concreto no processo de cicatrização da mucosa oral, tendo em vista o prolongamento do processo inflamatório apresentado nesse estudo. Além disso, os macrófagos ativados exercem papel importante na angiogênese, fazendo a regulação negativa desse processo, para isso, secretam fatores antiangiogênicos, como a endostatina, impedindo que ocorra a vascularização em excesso, em virtude disso o processo inflamatório prolongado interfere na atividade regulatória dessas células. Todavia, mesmo sem diferenças estatísticas significativas quando se observa a figura 74 verificou-se o aumento celular principalmente no grupo G4.

Observando os resultados desse estudo Rodrigues *et al*. (2022) também avaliaram a expressão de CD31 e obtiveram maior imunoexpressão de CD31 desde o 1° dia após ulceração até o último dia de experimento. A alogliptina (medicamento testado no experimento), portanto, pode ter contribuído para o aumento da expressão CD31 em todos os grupos tratados em virtude do prejuízo causado à ativação dos macrófagos, interferindo na atividade regulatória dessas células.

Tabela 18. Análise do CD31 entre os grupos experimentais.

	Tempo		
Grupos	**Dia 5**	**Dia 10**	**Valor-P**
1	53,50 (± 31,44) Ba	65,50 (± 21,29) Ca	0,2971
2	66,80 (± 12,95) ABa	74,83 (± 26,71) BCa	0,7150
3	74,20 (± 7,09) ABa	67,20 (± 9,42) Ca	0,2492
4	97,00 (± 35,05) ABa	130,33 (± 46,71) ABa	0,1495
5	111,17 (± 29,71) Aa	150,00 (± 43,61) Aa	0,2002
Valor-P	*0,0234*	*0,0017*	

Média ($\pm Desvio\ Padrão$*)* | Pós teste de Dunn | Letras maiúsculas comparação entre os grupos (Colunas) | Letras Minúsculas comparação intragrupos (Linhas) | *Nível de significância de 5%.*

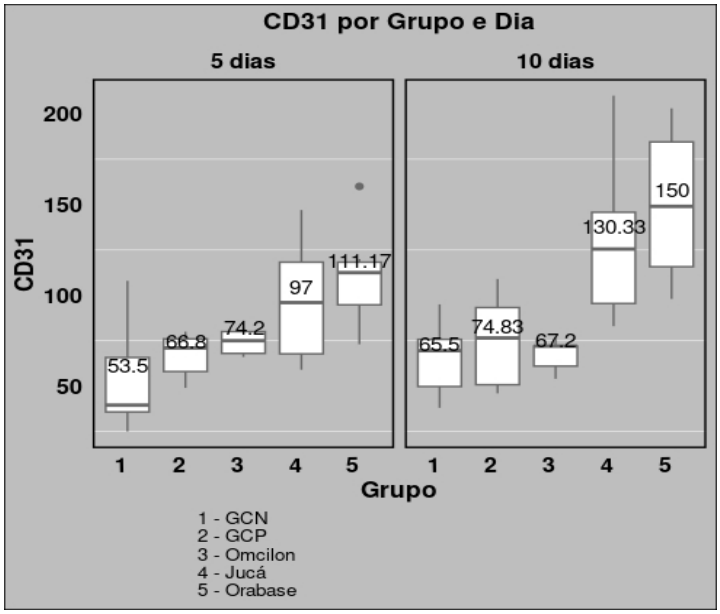
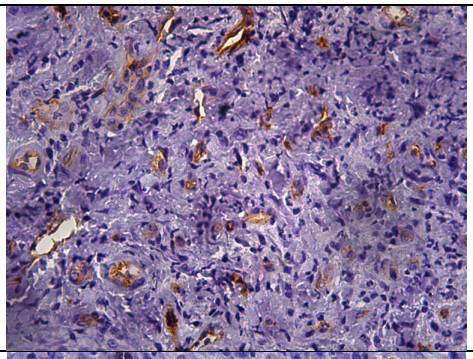
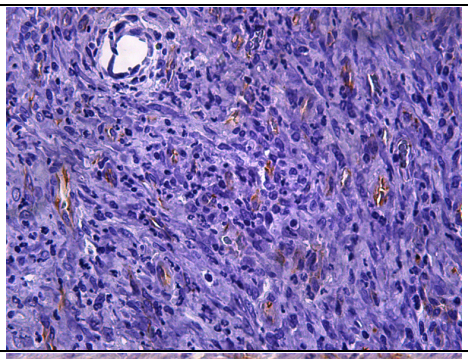
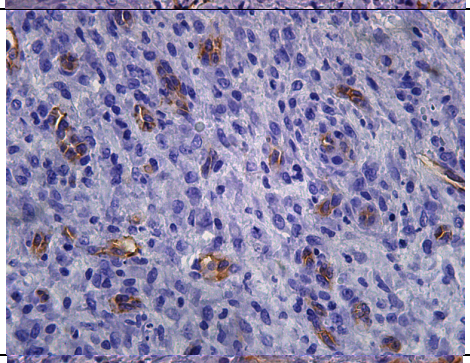
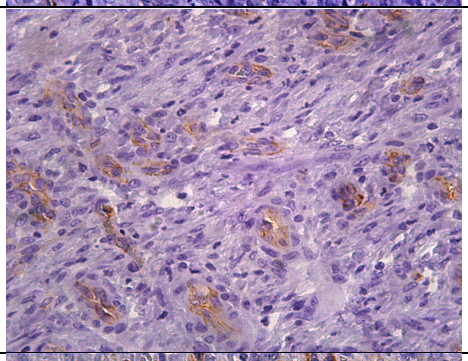
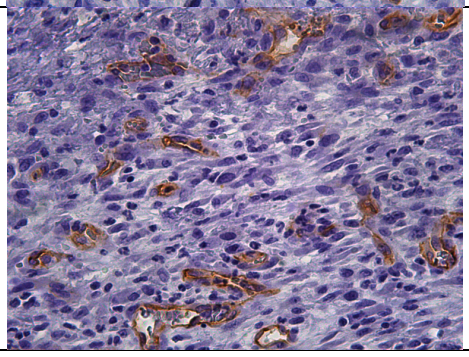
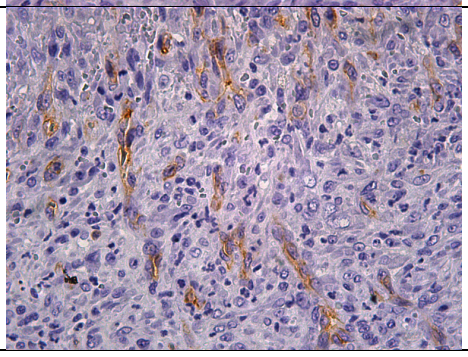
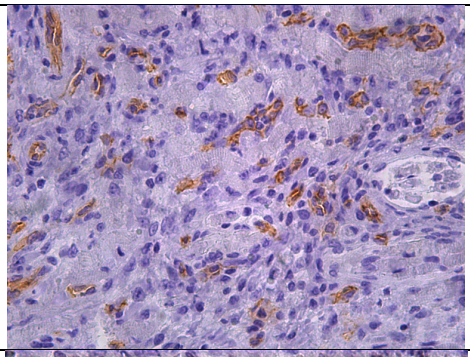
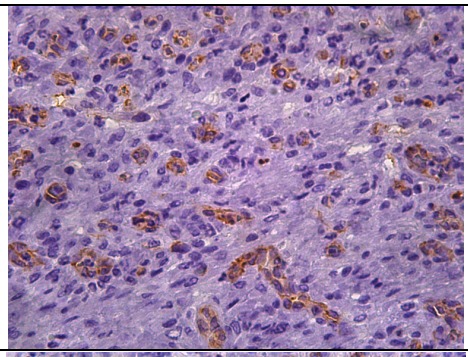
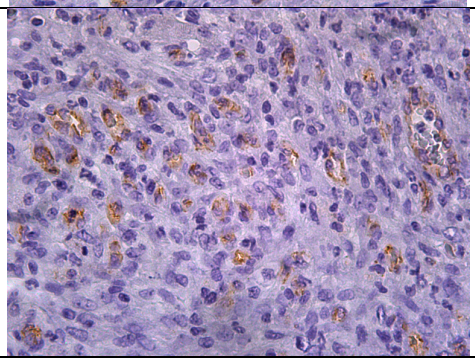
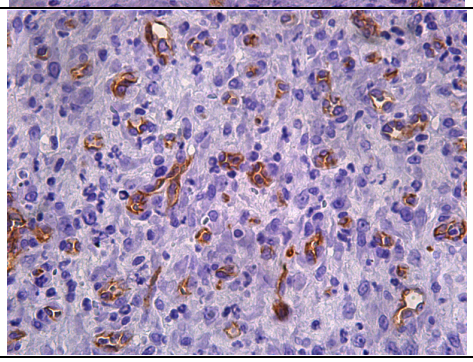


Figura 73. Variação do CD31, por período experimental, de acordo com os grupos.

Figura 74. CD31 – Análise imunohistoquímica dos grupos experimentais (aumento 400x).

	Dia 5	**Dia 10**
(G1)		
(G2)		
(G3)		

(G4)		
(G5)		

Avaliando-se os parâmetros histológicos e o painel imunohistoquímico, de um modo geral, observou-se que o grupo G4 demonstrou aumento gradativo e intensa atividade de colágeno total, colágeno tipo I, colágeno III, ratificando também com os parâmetros clínicos, a sua atividade biológica durante o processo de cicatrização tecidual dos ratos diabéticos. Paralelo a esses parâmetros, o estudo imunohistoquímico indicou um aumento do marcador inflamatório IL-1 nos primeiros dias de estudos e uma diminuição de TNF- α do dia 01 para o dia 05, corroborando com o fato de que o processo inflamatório agudo ocorre nos primeiros dias após o trauma, diminuindo ao decorrer do processo de reparação tecidual. Os marcadores teciduais de crescimento tiveram um aumento significativo nos grupos G2, G3 e G4, não diferindo no marcador CD31, corroborando com os achados de colágenos, visto que estes marcadores estimulam os fatores de crescimento e expressão de colágeno, contribuindo diretamente com a cicatrização tecidual.

Na sequência dos estudos realizados por Melo *et al.* (2022), ao comparar os grupos incluídos nos testes e analisar os resultados deste estudo pode-se sugerir a eficácia da pomada orabase de *L. ferrea* L. proposta para cicatrização de úlceras orais. Os ratos normossistêmicos testados por Melo *et al.* (2022) com essa formulação apresentaram processo cicatricial mais rápido e eficiente em relação aos demais grupos. Não obstante, nos ratos diabéticos mesmo com o retardo cicatricial demonstrado nos resultados desse experimento, observou-se a evolução cicatricial principalmente quando se compara o grupo G4 (pomada orabase de *L. ferrea* L) aos demais grupos.

Apesar de poucos estudos com a *Libidibia ferrea* L. para tratamento de úlceras orais, a utilização dessa no tratamento de feridas mostra-se benéfico, favorecendo o reparo tecidual. Essa resposta pode estar relacionada aos componentes da formulação visto que a vaselina sólida e líquida tem ação emoliente e a *L. ferrea* L. atividade cicatrizante já observada em literatura (BRASIL, 2016; Kobayashi *et al.,* 2015; Melo *et al.* 2022; Oliveira *et al*., 2010; Soares *et al*., 2013). Portanto, por pacientes portadores de DM apresentarem um retardo cicatricial, sugere-se a avaliação do processo inflamatório por mais de 10 dias, para uma ponderação completa do reparo tecidual entre os grupos estudados.

A formulação farmacêutica orabase de *Libidibia ferrea* L. traz uma nova abordagem terapêutica para melhorar a saúde bucal e os resultados dos tratamentos odontológicos. Essas inovações farmacêuticas trazem novas esperanças para o tratamento eficaz e preventivo de aftas, melhorando significativamente a qualidade de vida dos pacientes normossistêmicos e diabéticos. Contudo, para garantir a fundamental segurança, eficácia e qualidade desta nova formulação farmacêutica em orabase necessitam-se de testes clínicos para indicar possíveis efeitos colaterais e reações adversas que podem não ter sido detectadas em estudos pré-clínicos, ou problemas de segurança que só podem se manifestar após o uso prolongado, especialmente nas diferentes fases dos ensaios clínicos, garantindo um tratamento seguro e eficaz em seres humanos.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, concluiu-se que:

- A caracterização química demonstrou a presença de cinco compostos dentre eles: ácido gálico, ácido elágico, orientina, diglicosídeo dihidroxibenzoato, e isorhamentina.
- A formulação testada apresentou estabilidade físico-química em todos os tempos e condições de armazenamento, sem alteração de cor, odor e consistência, elevada viscosidade
- A formulação testada apresentou ausência de contaminantes bacterianos e/ou fúngicos em todos os tempos e condições de armazenamento.
- Houve redução clínica significativa das úlceras tratadas com a pomada orabase de *L. ferrea* L. em ratos diabéticos quando comparada aos demais grupos. Histologicamente, apesar de nenhum grupo ter demonstrado total reepitelização e reparo tecidual, observou-se boa remodelação da nova matriz celular nos grupos tratados com a pomada orabase de *L. ferrea* L., em 10 dias.
- Mesmo sem diferenças significativas entre os grupos testados os ratos normossistêmicos e o ratos diabéticos tratados com a pomada orabase *L. ferrea* L. apresentaram os melhores resultados imuno-histoquímicos para atividade de colágeno total, tipo I e tipo III, demonstrando maior produção em 10 dias de experimento.
- Ao analisar a imuno-histoquímica dos mediadores inflamatórios TNF-α e IL-1, bem como os fatores de crescimento TGF-β e CD31, demonstrou-se a redução da área ulcerativa em todos os grupos testados, principalmente nos ratos normossistêmicos e o ratos diabéticos tratados com a pomada orabase *L. ferrea* L., mesmo com o prolongamento da fase inflamatória aguda em ratos diabéticos observou-se a diminuição dos mediadores inflamatórios e o aumento dos fatores de crescimento.

Ponderando os resultados apresentados, a formulação apresentou estabilidade físico-química em todas as condições de armazenamento e tempo testados, indicando os melhores resultados no armazenamento em geladeira, bem como uma efetividade no reparo tecidual de ratos diabéticos, sugerindo a indicação da atividade cicatricial da formulação fitoterápica proposta quando utilizada para tratamento de úlceras orais.

REFERÊNCIAS

ABID WK, NASER AI. The efficacy of a new paste formulation as an alternative therapeutic agent for traumatic ulcers. Journal of Taibah University Medical Sciences. 16(5): 724-732, 2021.

AKKARI ACS, MUNHOZ IP, TOMIOKA J, SANTOS NEMBF, SANTOS RF. Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. Gest Prod. (23) 2: 365-380, 2016.

ALBERTI LR, VASCONCELLOS LS, PETROIANU A. Influence of local or systemic corticosteroids on skin wound healing resistance. Acta Cirúrgica Brasileira. 27: 295–299, 2012.

ALLEN TM, CULLIS PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. Science. 303(5665): 1818-1822, 2004.

ALMASSY JUNIOR AA, LOPES RC, ARMOND C, SILVA F, CASALI VWD. Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana. Viçosa, 2005.

ALMEIDA NCOS, SILVA FRP, CARNEIRO ALB, LIMA ES, BARCELOS JFM, FURTADO SC. *Libidibia ferra* (jucá) anti-inflamattory action: A systematic review of *in vivo* and *in vitro* studies. Plos One. 16(11):2021.

ALVES PM, QUEIROZ LMG, PEREIRA JV, PEREIRA MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente, antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero Cândida. Rev Soc Bras Med Trop. (42)2: 222-224, 2009.

ALVES APNN et al. Avaliação microscópica, estudo histoquímico e análise de propriedades tensiométricas da pele de tilápia do Nilo. Revista Brasileira de Queimaduras, Goiânia. (14) 3: 203-210, 2015.

ANVISA. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília, 2003.

ANVISA. Consolidado de normas da coordenação de fitoterápicos, dinamizados e notificados. Brasília, 2013.

ARAÚJO EAM, LINS MA, LIMA GR, MORESCHI ARC, LIMA ES, HANAN SA, TODA C, BANDEIRA MFCL. Atividade do óleo de copaíba sobre radicais livres formados durante a resposta inflamatória. Braz J of Develop. 6(7): 53538-53553, 2020.

ARAÚJO EAM, LIMA GR, MELO LAS, SOUSA LB, VASCONCELLOS MC, CONDE NCO, TODA C, HANAN SA, FILHO, AOA. Effect of a Copaiba Oil-Based Dental Biomodifier on the Inhibition of Metalloproteinase in Adhesive Restoration. Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. 2021.

BALBINO CA, PEREIRA LM, CURI R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. Rev Bras Cienc Farmac. (41)1, 2005.

BANDEIRA MFC, LIMA GR, LOPES PP, TODA C, VENANCIO GN, LIMA GA, VASCONCELLOS MC, MARTINS LM, SAMPAIO FC, CONDE NCO. Dentin cleaning ability of an amazona bioactive: evaluation by scanning electron microscopy. The Open Dentistry Journal. (10):1-6, 2016.

BARATA-SILVA C, HAUSER-DAVIS RA, SILVA ALO, MOREIRA JC. Desafios ao controle da qualidade de medicamentos no Brasil. Cad Saúde Colet. (25)3: 362-370, 2017.

BARBUL A. History of wounds healing, p.25-78. In: Brunicardi F.C., Seymour I., Schwarts D.L., Dun D.K. & Andersen R.E. Schwartz's Surgery. Companion handbook, Ontario, 2006.

BARKAT A, GOYAL A, BARKAT HA, SALAUDDIN M, POTTOO FH, ANWER ET. Herbal medicine: Clinical persperctive and regulatory status. Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening. 24: 1573-1582, 2021.

BASCONES-MARTINÉZ A, FIGUERO-RUIZ E, ESPARZA-GÓMEZ GC. Úlceras orales. Med Clin. 125(5): 590-7, 2005.

BAUER AW, KIRBY WM, SHERRIS JC, TURCK M. Antibiotic suscetibility testing by a standardized single disk method. The American Journal of Clinical Pathology. (45)4, 1996.

BELLENGUER-GUALLAR I, JIMENEZ-SORIANO Y, CLARAMUNT-LOZANO A. Treatment of recurrent aphtous stomatitis. A literature review. J Clin Exp Dent. 6(2):168-174, 2014.

BERKOWITZ BA. Avaliação básica e clínica de novas drogas. In: KATZUNG B.G. Farmacologia básica & clínica. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

BETTEGA PVC, CZLUSNIAK GR, PIVA R, NAMBA EL, RIBAS CR, GREGIO AMT, ROSA EAR. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da faramcia. Archives of oral research. 7(1): 89-97, 2011.

BILODEAU EA, LALLA RV. Recurrent oral ulceration: Etiology, classification, management and diagnostic algorithm. Periodontology 2000. 80: 49-60, 2019.

BÔAS GKV, GADELHA CAG. Oportunidade na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma politica nacional. Cad Saúde Pública. 23(6):1463-1471, 2007.

BORELLA JC, RIBEIRO NS, TEIXEIRA JCL, CARVALHO DM. A. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de Calendula officinalis L (Asteraceae). Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.31 (2): 193-197, 2010.

BRASIL GRL, CAVALCANTE LS, BARI CN, VASCONCELLOS MC, CONDE NCO, TODA C, HANAN C, BANDEIRA MFCL. Avaliação da atividade antibacteriana de um biomodificador dentinário à base de óleo de *Copaifera multijulga* Hayne. Research, Society and Development. 11(9), 2022.

BRASIL GRL. Atividade da emulsão à base de óleo de *Copaifera multijulga* Hayne como biomodificador da matriz dentinária. Tese (Doutorado em Inovação farmacêutica). UFAM, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Políticas de Saúde. Manual de condutas para úlceras neutróficas e traumáticas. 2.ed. Brasília: 55p, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 89 DE 16 de Março de 2004. Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n° 1 de 29 de Julho de 2005. Brasília: ANVISA, 2005.

BRASIL. Resolução nº 67, de 8 de outubro de 2007. Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficinais para Uso Humano em farmácias, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 17 de 16 de Abril de 2010. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 17 de 16 de Abril de 2010. Dispões das boas práticas de fabricação de medicamentos. Brasília: ANVISA, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de fitoterápicos de farmacopeia brasileira. Brasília: ANVISA, 2011.

BRASIL. Subcomitê Técnico de Logística do Núcleo de Assistência Farmacêutica do HCFMUSP. Guia de Boas Práticas de fornecedores de medicamentos e insumos farmacêuticos., 5ª Edição. São Paulo, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 13 de 14 de Março de 2013. Brasília: ANVISA, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 26 de 13 de Maio de 2014. Brasília: ANVISA, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2022.

BROUGHTON G II, COL MC, JEFFREY E, JANIS MD, CHRISTOPHER E, ATTINGER MD. The basic science of wound healing. American Society of Plastic Surgeons. 117(7s): June, 2006.

BRIZENO LAC, ASSREUY AMS, ALVES APNN, SOUSA FB, SILVA PGB, SOUSA SZOM, LASCANE NAS, EVANGELISTA JSM, MOTA MRL. Delayed healing of oral

mucosa in a diabetic rat model: Implication of TNF-α, IL-1β and FGF-2. Life Sciences. April, 2016.

BRUSCHI ML & FREITAS O. Oral bioadhesive drug delivery systems. Drug Development and Industrial Pharmacy. 31: 293–310, 2005.

BUENO J. Bioprospecting and Drug Development, Parameters for a Rational Search and Validation of Biodiversity. J Microb Biochem. 2017.

BUFFON MCM, LIMA MLC, GALARDA I, COGO L. Avaliação da eficácia dos extratos de Malva sylvestris, Calendula officinalis, Plantago major e Curcuma Zedoarea no controle do crescimento das bactérias da placa dental. Estudo "in vitro". Revista visão acadêmica. (2): 31-38, 2001.

CALIXTO JB. Efficacy, safety, quality control, markentig and regulatory guidelines for herbal medicines (phytherapeutic agents). Brazilian Journal of Medical and Biological Reasearch. 33: 179-189, 2000.

CALIXTO JB. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin American: a personal view. Journal of Ethnopharmacology. 100:131-134, 2005.

CALIXTO JB, SIQUEIRA JUNIOR JM. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. Gaz Med Bahia. (78)1: 98-106, 2008.

CAMPISI G, COMPILATO D, CIRILLO N, CIAVARELLA D, PANZARELLA V, AMATO S, LO MUZIO L. Oral ulcers: three questions on their physiopathology. Minerva Stomatologica, 56: 293–302, 2007.

CAMPOS ACLC, BORGES-BRANCO A, GROTH AK. Cicatrização de feridas. Arq. Bras. Cir. Dig. 20(1): Mar, 2007.

CARVALHO ACB, BALBINO EE, MACIEL A, PERFEITO JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Rev Bras Farmacogn. 18(2): 314-319, 2008.

CARVALHO PTC, SILVA IS, REIS FA, PERREIRA DM, AYDOS RD. Influence of ingaalp laser (660nm) on the healing of skin wounds in diabetic rats. Acta Cir. Bras. 25 (1): jan./fev. 2010.

CARVALHO ACB, BRANCO PFB, FERNANDES LA, MARQUES RFO, CUNHA SC, PERFEITO JPS. Regulação brasileira de plantas medicinais e fitorapicos. Rev Fitos. (7)1: 2012.

CARVALHO ACB, PERFEITO JPS, SILVA LVC, RAMALHO LS, MARQUES RFO, SILVEIRA D. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. Jornal of Ethnopharmacology. (158): 503-506, 2014.

CARVALHO FC, CHORILLI M, GREMIÃO MPD. Plataformas bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos – propriedades, metodologia e aplicações. Polímeros. 24 (2): 203-213, 2014.

CARVALHO ACB, LANA TN, PERFEITO JPS, SILVEIRA D. The brazilian market of herbal medicine products and the impacts of the new legislation on tradicional medicines. Journal of Ethnopharmacology. (212): 29-35, 2018.

CASTRO RD, OLIVEIRA JA, VASCONCELOS LC, MACIEL PP, BRASIL VLM. Brazilian scientific production on herbal medicines used in dentistry. Rev. Bras. Pl. Med. 16(3): 618-627, 2014.

CAVALCANTE GM, PAULA RJS, SOUSA LP, SOUSA FB, MOTA MRL, ALVES APNN. Experimental model of traumatic ulcer in the cheek mucosa of rats. Acta Cirúrgica Brasileira. 26: 227–234, 2011.

CAVALHEIRO MG, FARIAS DF, FERNANDES GS, NUNES EP, CAVALCANTI FS, VASCONCELOS IM, MELO VMM, CARVALHO AFU. Atividades biolo1gicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de Caesalpinia ferrea Mart., Leguminosae. Rev Bras Farmacogn. 19(2B): 586-91, 2009.

CECHINEL-ZANCHETT CC. Legislação e controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos nos países do Mercosul. Infarma Ciências Farmacêuticas. 2893): 123-139, 2016.

CHAVAN M, JAIN H, DIWAN N, KHEDKAR S, SHETE A, DURKAR S. Recurrent aphthous stomatitis: a review. Journal of Oral Pathology & Medicine. 41: 577–583, 2012.

CHECHINEL-FILHO VC, YUNES RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova. 21(1), 1998.

CLARK RAF. Wound repair. In: Kumar, Robbins, Cotran: Pathologic Basis of Disease. 7. ed. Ed. Saunders. p.112, 2005.

COLLIER HO, DINNEEN LC, JOHNSON CA, SCHNEIDER C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Br J Pharmacol Chemother. (32): 295-310, 1968.

COMPILATO D, CIRILLO N, TERMINE N, KERR AR, PADERNI C, CIAVARELLA D, CAMPISI G. Long-standing oral ulcers: proposal for a new: “S-C-D classification system”. J Oral Pathol Med. 38: 241-253, 2009.

CONDE NCO, PEREIRA MSV, BANDEIRA MFCL, VENÂNCIO GN, OLIVEIRA GP, SAMPAIO FC. In vitro antimicrobial activity of plants oh the Amazon on oral biofilm micro-organisms. Journal of Dental Sciences. 30: 170-183, 2015.

CONDE NCO, PEREIRA MSV, BANEIRA MFCL, VENANCIO GN, OLIVEIRA GP, SAMPAIO FC. Atividade antimicrobiana in vitro de plantas da Amazônia sobre alguns microrganismos formadores do biofilme dental. Revista Odonto Ciência. (30): 179, 2016.

COSTA LM, GUILHON-SIMPLICIO F, SOUZA TP. L*ibidibia ferrea* (Mart ex Tul.) L.P. queiroz var *ferrea*: pharmacological, phytochemical and botanical aspects. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 7(4), 2015.

COSTA RPC, GUIMARAES ALA, VIEIRA ACM. Avaliação da qualidade de amostras de plantas medicinais comercializadas no Brasil. Rev Cienc Farm Basica Aplic. 35(3): 425-433, 2014.

DUARTE CME, QUIRINO MRS, PATROCÍNIO MC, ANBINDER AL. Effects of Chamomilla recutita (L.) on oral wound healing in rats. Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal. 16: 716–721, 2011.

DAVID B, WOLFENDER JL, DIAS DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. Phytochemistry reviews, 14(2): 299-315, 2015.

DEBNATH K, DAS D, GOSWAMI N, BARAI S, MANDRIYA K, NISHA S. Oral aspects in diabetes: decoding the silente killer. International Journal of Nutrition, pharmacology, Neurological Diseases. 12: 85-91, 2022.

DESTA T, LI J, CHINO T, GRAVES DT. Altered Fibroblast Proliferation and Apoptosis in Diabetic Gingival Wounds. J Dent Res. 89 (6): 609-614, 2010.

DI STASY LC, HIRUMA-LIMA CA. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2.ed. São Paulo: Unesp, 2002.

DROZINO RN, ZULIN MJP, CASAGRANDE L, PEREIRA AV. Breve revisão: bioativos de Libidibia ferrea e suas ações em odontologia. Arquivos do MUDI. 21(1): 39-47, 2017.

EBAID H, ABDEL-SALAM B, HASSAN I, AL-TAMIMI J, METWALLI A, ALHAZZA I. Camel milk peptide improves wound healing in diabetic rats by orchestrating the redox status and immune response. Lipids Health Dis. 14:132, 2015.

EDDY NB, LEIMBACH D. Synthetic analgesics: dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. J Pharmacol Exp Ther. (107): 385-393, 1953.

EDGAR NR, SALEH D, MILLER RA. Recurrent Aphtous Stomatitis: a review. Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology. 10(3): Março, 2017.

ELAMROUSY WA, MORTADA A, SHOUKHEBA M. Evaluation of novel topical camel whey protein gel for the treatment of recurrent aphthous stomatitis: randomized clinical study. J Int Soc Prev Community Dent. 11(5): 574-581, 2021.

EVANGELISTA SS, SAMPAIO FC, PARENTE RC, BANDEIRA MFCL. Fitoterápicos na odontologia: estudo etnobotânico na cidade de Manaus. Rev Bras Pl Med. (15)4: 513-519, 2013.

FANTOZZI PJ, TREISTER N, SHEKAR R, WOO SB, VILLA A, MPH. Intralesional triamcinolone acetonide therapy for inflammatory oral ulcers. Oral medicine. 12(5), 2019.

FITZPATRICK SG, COHEN DM, CLARK AN. Ulcerated Lesions of the oral mucosa: clinical and histologic review. Head and Neck Pathology, 2019.

FRANCISCO KSF. Fitoterapy: an option in odontological treatment. Revista Saúde da Faculdade de Odontologia de Araçatuba. 4(1): 50-56, 2010.

GASMI BA, NOOR SM, MENZEL A, GASMI A. Oral Aphthous: Pathophysiology, Clinical Aspects and Medical Treatment. Archives of Razi Institute. 76(5): 1155-1163, 2021.

GIL ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. Pharmabooks. (2): 27- 41, 2007.

GOIS TS, de JESUS CVF, SANTOS RJ, OLIVEIRA FS, FEITOSA L, SANTANA MF., da SILVA M.C., da SILVA R.N., TELES W.S. Fisiopatologia da cicatrização em pacientes portadores de diabetes mellitus. Brazilian Journal of Health Review. 4(4): 14438-14452, 2021.

GONZALES FG, BARROS SBM, BACCHI EM. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de Caesalpinia ferrea mart. Braz J Pharmac Sci. (40)1: 79-83, 2004.

GONZALES ACO, ANDRADE ZA, COSTA TF, MEDRADO ARAP. Wound healing – A literature review. An Bras Dermatol. 91(5): 614-20, 2016.

GRAVEZ DT, CORREA JD, SILVA TA. The oral microbiota is modified by systemic diseases. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 98(2): 148-156, 2019.

GRINN UARS. National Genetic Resource Program. Germplasm Resources Information Network. Online Database, 2015.

GROSS JL, SILVEIRO AP, CAMARGO JL, REICHELT AJ, AZEVEDO MJ. Diabetes Melito: Diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. Arq Bras Endocrinol Metab. (46), 2002.

GUIDO RVC, ANDRICOPULO AD, OLIVA G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. Revista Estudos Avançados. (24)70: 81-98, 2010.

GUPTA D, BLEAKLEY B, GUPTA RK. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. J Ethnopharmacol. (115): 361-380, 2008.

HAMISHEHKAR H, NIKHODCHI A, GHANBARZADEH S, KOUHSOLTANI M. Triamcinolone Acetonide Oromucoadhesive Paste for Treatment of Aphthous Stomatitis. Adv. Pharm Bull. 5(2): 227-282, 2015.

HASENCLEVER L, PARANHOS J, COSTA CR, CUNHA G, VIEIRA D. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. Ciência & Saúde Coletiva. 22(8): 2559-2569, 2017.

HENRIQUES MG, RAES GA, CORDEIRO RS, WILLIAMS TJ. Endothelin-1 inhibits PAF-induced paw edema and pleurisy in the mouse. Br J Pharmacol. (106): 579-582, 1992.

HOSEINPOUR H, PEEL AS, RAKHSHANDEH H, FOROUZANFAR A, TAHERI M, RAJABI O, SALJOGHINEJAD M, SOHRABI K. Evaluation of rosa damascene mouthwash

in the treatment of recurrent aphtous stomatitis: a randomized, doubleblinded, placebo-controlled clinical trial. Quintessence Int. (42):483-491, 2011.

HOSTETTMANN K. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos. (9): 60-61, 2003.

HUNSKAAR S, FASMER OB, HOLE K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. J Neurosci Meth. (14): 69-76, 1985.

IAUK L, LO BLUE AM, MILAZZO I, RAPISARDA A, BLADINO G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. Phytother Rev. (17): 599-604, 2003.

IBIAPINA WN, LEITAO BP, BATISTA MM, PINTO DS. Inserção da fitoterapia na atenção primária aos usuários do SUS. Revista de Ciência Saúde Nova Esperança. Jun. 12(1):58-58, 2014.

ISAAC VLB, CEFALI LC, CHIARI BG, SALGADO HRN, CORREA MA. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 29(1): 81-96, 2008.

ISAAC C, REGO FMP, LADEIR PRS, ALTRAM SC, OLIVEIRA RC, ALDUNATE JLCB, PAGGIARO AO, PEREIRA MC. Construção de substituto da pele composto por matriz de colágeno porcino povoada por fibroblastos dérmicos e queratinócitos humanos: avaliação histológica. Rev Bras Cir Plást. (27) 4: 503-508, 2012.

JU HM, AHN YW, JEONG SH, JEON HM, KIM KH, SONG BS, OK SM. Characteristics of patients who perceive dental treatment as a cause of oral mucosal lesions. Journal of Oral Science, July, 2019.

JÜTTE R, HEINRICH M, HELMSTÄDTER A, LANGHORST J, MENG G, NIEBLING W, POMMERENING T, TRAMPISCH HJ. Herbal medicine products – evidence and tradition from a historical perspective. Journal of Ethnopharmacology. 207: 220-225, 2017.

KHAWAR IA, KIM JH, KUH HJ. Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment. J Control Release. (201): 78-89, 2015.

KIGNEL J. Estomatologia: Bases do diagnóstico para o clínico geral. São Paulo: Santos, 2007.

KOBAYASHI YTS, ALMEIDA VT, BANDEIRA T, ALCANTARA BN, da SILVA ASB, BARBOSA WLR, da SILVA PB, MONTEIRO MVB, ALMEIDA MB. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. Bras J Vet Res Anim. 52(1): 34-40, 2015.

KOIVISTO L, HEINO J, HAKKINEN L, LARJAVA H. Integrins in wound healing. Adv Wound Care. (3) 12: 762-783, 2014.

KWON DS, GAO X, Yong Bo LIU YB, DULCHAVSKY DS, DANYLUK AL, BANSAL M, CHOPP M, MCINTOSH K, ARBAB AS, DULCHAVSKY SA, GAUTAM SC. Treatment with bone marrow-derived stromal cells accelerates wound healing in diabetic rats. International Wound Journal. 5 (3): 453-463, 2008.

KUDIYIRICKAL MG, PAPPACHAN JM. Diabetes mellitus and oral health. Endocrine. 49:27-34, 2015.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Robbins e Cotran – *Patologia: bases patologicas das doencas.* 7a ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005.

KUMAR G, JALALUDDIN M, ROUT P, MOHANTY T, DILEEP CL. Emerging trends of herbal care in dentistry. J Clin Diagn Res. 7: 1827-1829, 2013.

LANDOVÁ H. et al. Mucoadhesive films as perspective oral dosage form. Ceska Slov Farm, 62: 4-11, 2013.

LEME JACA, CASTELLAR A, REMEDIO RN, BARBOSA RA, MOURA LP, DALIA RA, GOMES RJ, CAETANO FH, MELLO MAR, LUCIANO E. Efeitos em curto prazo da aplicação de aloxana para indução de diabetes em ratos wistar. Biosci. J. 26(3): 451-456, 2010.

LEONARDI GR, GASPAR LR, CAMPOS PMBGM. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. Na Bras Dermatol. (77)5: 563-569, 2002.

LEWIS G, SCHIRIRE B, MACKINDER B, LOCK M. Legumes of the world. Royal Botanic Gardnes: Kew, 2005

LI FS, WENG JK. Demystifying traditional herbal medicine with modern approaches. Nature Plants. (3), 2017.

LI X.-P. et al. LPS induces activation of the TLR4 pathway in fibroblasts and promotes skin scar formation through collagen I and TGF-β in skin lesions. International journal of clinical and experimental pathology. 12 (6): 2121-2129, 2019.

LIMA GR, CAVALCANTE LS, MOAES BF, ARAUJO EAM, MILÉRIO PSLL, CONDE NCO, TODA C, HANAN SA, BANDEIRA MFCL. Quality control os dentin biomodiffiers based on Copaiba oil. Conjecturas. 22(2), 2022.

LIMA JUNIOR JF, DIMENSTEIN M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: visão do odontólogo. Saúde Rev. (8):1937-1944, 2006.

LINS MA, GUIMARÃES VMM, CASAROTO AR, da SILVA MJA; VASCONCELLOS MC, LIMA ES; MELO LAS, BANDEIRA MFCL; CONDE NCO, TODA C. Cytotoxicity ande potencial anti-inflamatory activity *Libidibia ferrea* L. extract on RAW 264.7 macrophages. Conjecturas, 22(5), 2022.

LIU ZJ, VELAZQUEZ OC. Hyperoxia, Endothelial Progenitor Cell Mobilization, and Diabetic Wound Healing. Antioxid Redox Signal. 10: 1869-1882, 2008.

LUO H, WU B, KAMER AR, ADHIKARI S, SLOAN F, PLASSMAN BL, TAN C, QI X, SCHWARTZ MD. Oral health, diabetes, and inflammation: Effects of oral hygiene behaviour. International Dental Hournal. 72: 484-490, 2022.

MACEDO NS, SILVEIRA ZS, BEZERRA AH, COSTA JJGM, COUTINHO HDM, ROMANO B, CAPASSO R, CUNHA FAB, SILVA MV. *Caesalpinia ferrea* C. *Mart* (Fabaceae) Phytochemistry, Ethnobotany, and Bioactivities: A Review. Molecules. 25: 3831, 2020.

MACIEL MAM, PINTO AC, VEIGA JUNIOR VF, GRYNBERG NF, ECHEVARRIN A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. Química Nova. (25)3: 429-438, 2002.

MAGALHAES LS, PUSSENTE CG, AZEVEDO LR, CRESPO JMRS. Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de Caesalpinia ferrea Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética. Revista Científica da Faminas. (11)1: 2015.

MAIA GN. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: Leitura & Arte, 2004.

MARAFON M, LOPES GLN, OLIVEIRA VMV, SOARES LM, CARVALHO ALM, GUIMARES SS. Caracterização físico-química e biofarmacotécnica de pomadas orabase de triancinolona. Boletim Informativo Geum. (7)2: 32-38, 2016.

MARREIRO RO, BANDEIRA MFCL, SOUZA TP, ALMEIDA MC, BENDAHAM K, VENANCIO GN, RODRIGUES IC, COELHO CN, MILERIO PSLL, OLIVEIRA GP, CONDE NCO. Evaluation of the stability and antimicrobial activity of na ethanolic extract of *Libidibia ferrea*. Clinical and Investigation Denstristy. (6):9-13, 2014.

MARTÍNEZ CC, GÓMEZ MD, OH MS. Use of traditional herbal medicine as an alternative in dental treatment in Mexican dentistry: a review. Pharmaceutical Biology. 55(1): 1992-1998, 2017.

MAIS ECDJ, CAMPOS ACL, MAIS FDJ, SOATTIRATTI MA, SHINIKE I, MAIS RDJ. A influência de fatores de crescimento na cicatrização de feridas cutâneas de ratas. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. 82(5): 512-521, 2016.

MATOS AJP. Controle de qualidade físico-químico de uma formulação de pomada orabase de *Libidibia ferrea* ex. *Caesalpinia ferrea* L. Dissertação (Mestrado em ciências odontológicas). UFAM, 2016.

MATTOS G, CAMARGO A, SOUZA CA, ZENI ALB. Plantas Medicinais e fitoterapicos na atenção primária e, saúde: percepção dos profissionais. Ciência & Saúde Coletiva. 22(8): 2559-2569, 2018.

MAURI-OBRADORS E, ESTRUGO-DEVESA A, JANÉ-SALAS E, LÓPEZ-LÓPEZ J. Oral manifestations of Diabetes Mellitus. A systematic review. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 22(5): e586-594, 2017.

MAZZARINO L; BORSALI R AND LEMOS-SENNA E. Mucoadhesive films containing chitosan-coated nanoparticles: A new strategy for buccal curcumin release. Journal of Pharmaceutical Sciences, 103: 3764-3771, 2014.

MEIRA JF, LIMA GR, LIBÓRIO-KIMURA TN, VASCONCELLOS MC, SAMPAIO FC, TODA C, CONDE NCO, BANDEIRA MFCL. Histomorphometric evaluation of the effect of

a copaíba oil-based (*Copaifera multijuga* Hayne) dentin biomodifier on the hybrid layer. Braz J of Develop. 6(9): 65445-65458, 2020.

MELO LAS. Controle de qualidade físico-químico e efeito cicatricial de uma pomada orabase de extrato de Libidibia ferrea L. para o tratamento de úlceras da cavidade bucal. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Amazonas, 2019.

MELO LAS, TODA C, SOUZA TP, MATOS AJP, SANTOS LLC, SABELLI KSM, BANDEIRA MFCL, CONDE NCO. Physicochemical assessment of na orabase formulation of *Libidibia ferrea* L. Brazilian Journal of Development. 8(9):60958-60972, 2022.

MENDONÇA FAS, PASSARINI JUNIOR JR, ESQUISATTO MAM, MENDONÇA JS, FRANCHINI CC, SANTOS GMT. Effects of the application of Aloe vera (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. Acta Cirúrgica Brasileira. 24: 150–155, 2009.

MESQUITA KC, DANTAS TS, SILVA PGB, ROGRIGUES MIQ, ALVES APNN, MOTA MRL, SOUSA FB. Abatacept treatment impairs the cell migration and wound healing of oral ulcers in rats: Role of interleukin (IL)-1β and -6 and -10 and CD8/CD30 cells. Influence of abatacept treatment on oral wound healing: Experimental model on rats. Life Sciences. 243: 117243, 2020.

MINHAS S, SAJJAD A, KASHIF M, TAJ F, WADDANI HA, KHURSHID A. Oral ulcers presentation in systemic diseases: an update. Open Acces Maced J Med Sci. 7(19): 3341-3347, 2019.

MIAO M, NIU Y, XIE T, YUAN B, QING C, LU S. Diabetes-impaired wound healing and altered macrophage activation: A possible pathophysiologic correlation. Wound Rep Reg. 20: 203–213, 2012.

MIRANDA KVL, UHLMANN, LAC. Uso de fitoterápicos na atualidade: uma revisão de literatura. Revista PubSaúde. 6:160, 2021.

MITSCHER LA, LEU RP, BATHALA MS, WU WN, BEAL JL. Antimicrobial agentes from higher plants: introduction, rationale and methodology. 35(2): 157-166, 1972.

MONTANHA FP, AZEVEDO MGP. Administração medicamentosa: vantagens e desvantagens das diferentes vias. Rev Cient eletrônica Med Vet. (20), 2013.

MONTES, GS, JUNQUEIRA, LCU. The use of the picrosirius- polarization method for the study of the biopathology of collagen. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 86 (3): 1-11,1991.

MOURA LG, NETO GP, BARI CNC, LIMA GR, TODA C, HANAN S., CONDE NCO, BANDEIRA MFCL. Dentin surface and hybrid layer morphological analysis after use of a copaiba oil-based dent biomodifier. Conjecturas. 21(4), 2021.

MUKHERJEE, S. Proteomic analysus of frozen tissue sampes using laser capture microdissection. Proteomics for biomarker discovery: methods and protocols. Methods in Biomolecular Biology. (1002): 1993.

MUNOZ-CORCUERA M, ESPARZA-GÓMEZ G, GONZÁLEZ-MOLES MA, BASCONES-MARTÍNEZ A. Oral ulcers: clinical aspects. A tool for dermatologists. Part I. Acute ulcers. Clin Exp Dermatol. 34(3):289-94, 2009.

NASCIMENTO JE. Produtos à base de plantas medicinais comercializados em Pernambuco - nordeste do Brasil. Acta Farmacêutica Bonaerense. (24)1: 113-22, 2005.

NASCIMENTO JÚNIOR BJ et al. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. 2015.

NASRY SA, EL SHENAWY HM, MOSTAFA D, AMMAR NM. Different modalities for treatment of recurrent aphthous stomatitis. A randomized clinical trial. J Clin Exp Dent. 8(5):e517-22, 2016.

NEVILLE BW; DAMM DD; ALLEN CM; BOUQUOT JE. Patologia Oral e Maxilofacial. Trad. 4a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

OLIVEIRA MJR, SIMOES MJS, SASSI CRR. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no estado de São Paulo, Brasil. Rev Bras Pl Med. 8(2): 39-41, 2006.

OLIVEIRA FQ, GOBIRA B, GUIMARAES C, BATISTA J, BARRETO M, SOUZA M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Rev Bras Farmacogn. (17)3, 2007.

OLIVEIRA AFO. Avaliação da atividade cicatrizante da *Caesalpinia ferrea* (tul.) *Martius* (jucá) em lesões cutâneas de caprinos. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-árido, 2008.

OLIVEIRA AF, BATISTA JS, PAIVA ES, SILVA AE, FARIAS YJMD, DAMASCENO CAR, BRITO PD, QUEIROZ SAC, RODRIGUEZ CMF, FREITAS CIA. Avaliação da atividade cicatrizante do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex. Tul var. *ferrea*) em lesões cutâneas de caprinos. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 12(3): 302-310, 2010.

OLIVEIRA IVPM, DIAS RVC. Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. Acta veterinária Brasilica. 6(4): 267-271, 2012.

OLIVEIRA GP, SOUZA TP, CAETANO SK, FARIAS KS, VENANCIO GN, BANDEIRA MFCL, CONDE NCO. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos da casca do caule e da vagem de *Libidibia ferrea* L. frente a microrganismos da cavidade bucal. Revista Fitos. 8(2): 73-160, 2013.

OLIVEIRA LP, LEÃO MLP, ALCÂNTARA CEP. Doenças sistêmicas e interdisciplinaridade: a importância do diálogo entre o cirurgião-dentista e o médico no tratamento e prognóstico de pessoas com enfermidades sistêmicas. Scire Saltuis. 11(2): 127-132, 2021.

OLIVEIRA-JUNIOR JM, FILHO NA, CHAUD MV, GONÇALVES MM, ARANHA N, LIMA-JUNIOR JR. Projeto e construção de uma picnômetro a ar para caracterização de insumos e produtos farmacêuticos. Quim Nova (33)6: 1384-1388, 2010.

O'NEILL ID, SCULLY S. Biologics in oral medicine: ulcerative disorders. Oral diseases. 2012.

PEDROSA TD, BARROS AO, NOGUEIRA JR, FRUET AC, RODRIGUES IC, CALCAGNO DQ. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (Libidibia ferrea Mart.) extracts. Archives of Dermatological Research. 08(9): 643-654, 2016.

PEREIRA MSV, RODRIGUES OG, FEIJÓ FMC, ATHAYDE ACR, LIMA EQL, SOUSA MRQ. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas do semi-árido paraibano. Agropecuária Científica no Semi-árido. (2)1: 37-43, 2006.

PEREIRA LP, da SILVA RO, BRINGEL PH, da SILVA KE, ASSREUY AM, PEREIRA MG. Polysaccharide fractions of Caesalpinia ferrea pods: Potential anti-inflammatory usage. Journal of Ethnopharmacology, 2012.

PESSANHA AFV, ROLIM LA, PEIXOTO MS, SILVA RMF, ROLIM-NETO PJ. Influência dos excipientes multifuncionais no desempenho dos fármacos em formas farmacêuticas. Rev Bras Farm. 93(2): 136-145, 2012.

PETERSMANN A, MÜLLER-WIELAND D, MÜLLER UA, LANDGRAL R, NAUCK M, FRECKMANN G, HEINEMANN L, SCHLEICHER E. Definition, classification and diagnosis of Diabetes Mellitus. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 127(Suppl 1): S1-S7, 2019.

PETROIANU A, ALBERTI LR, SOUZA SD, MARTINS SG. Effect of ascorbic acid and hidrocortisone on intestinal anastomotic tension. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 36: 509–513, 2009.

PINHEIRO L, RAPINI MS, PARANHOS J. Subvenção à inovação no setor farmacêutico brasileiro: uma análise a partir do nível de incerteza. Revista de Administração, Sociedade e Inovação. 7(1): 104-123, 2021.

PINTO TJA, KANEKO TM, OHARA MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2. Ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2003.

PRADO BN, VACCAREZZA GF. Alterações bucais em pacientes diabéticos. Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo. 25(2): 147-153, 2013.

RADAELLI V. A inovação na indústria farmacêutica: forças centrípetas e forças centrifugas no processo de intercionalizacao. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual de Campinas, 2006.

RAPALA K, LAATO M, NIINIKOSKI J, KUJARI H, SODER O, MAUVIEL A, PUJOL JP. Tumor necrosis factor alpha inhibits wound healing in the rat. European Surgery Research. 23: 261–268, 1991.

RASHID G, BENCHETRIT S, FISHMAN D, BERNHEIM J. Effect of advanced glycation end-products on gene expression and synthesis of TNF-alpha and endothelial nitric oxide synthase by endothelial cells. Kidney International. 66: 1099 –1106, 2004.

RATES SMK. Plants as source of drugs, Toicon 39: 603-613, 2001.

RAWAL SY, CLAMAN LJ, KALMAR JR, TATAKIS DN. Traumatic lesions of the gingiva: a case series. J Periodontol. 75(5):762-9, 2004.

REGEZI JA, SCIUBBA JJ, RICHARD CJ. in *Oral Pathology – Clinical Pathologic Correlations*. W. B. Saunders Company: Philadelphia. 143-152, 2008.

RODRIGUES MR, KOSARIC N, BONHAM CA, GURTNER GC. Wound healing: a cellular perspective. Physiol Rev. 99: 665-706, 2019.

RODRIGUES MIQ. Alogliptina retarda a cicatrização de úlceras traumáticas orais em mucosa jugal de ratos Wistar. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal do Ceará, 2022.

ROHANI B. Oral manifestations in patients with diabetes mellitus. World Journal of Diabetes. 10(9): 485-489, 2019.

ROSA W, DA SILVA DOMINGOS O, DE OLIVEIRA SALEM PP, CALDAS IS, MURGU M, LAGO JH. In vivo anti-inflammatory activity of Fabaceae species extracts screened by a new ex vivo assay using human whole blood. Phytochemistry Anal. 32(5): 859-883, 2021.

ROSSI S, SANDRI G, CARAMELLA CM. Buccal drug delivery: A challenge already won? Drug Discovery Today. Technologies. 2: 59-65, 2005.

SALVI GE, COLLINS JG, YALDA B, ARNOLD RR, LANG NP, OFFENBACHER S. Monocytic TNF- alpha secretion patterns in IDDM patients with periodontal diseases. Journal of Clinical Periodontology. 24: 8-16, 1997.

SAMPAIO FC, PEREIRA MSV, DIAS CS, COSTA VCO, CONDE NCO, BUZALAF MAR. In vitro antimicrobial activity of Caesalpinia ferrea Martius fruits against oral pathogens. Journal of Ethnopharmacology. 124: 289-294, 2009.

SANGEETHA S. et al. Mucosa as a route for systemic drug delivery, Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 1: 178-187, 2010.

SANTOS EB, DANTAS GS, SANTOS HB, DINIZ MFFM, SAMPAIO FC. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. Revista Brasileira de Farmaognosia. 19(1B): 321-324, 2009.

SANTOS RL, GUIMARAES GP, NOBRE MSC, PORTELA AS. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. Rev Bras Plantas Med. 13(4):486-491, 2011.

SANTOS JA, NORMANDO AGC, TOLEDO IP, MELO G, CANTO GL, SANTOS-SILVA AR, GUERRA ENS. Laser therapy for recurrent aphthous stomatitis: an overview. Clinical Oral investigations. 2019.

SANTOS JM, TEWARI S, MENDES RH. The role of oxidative stress in the development of Diabetes Mellitusand its complications. Journal of Diabetes Research. 2019.

SCHAFER M, WERNER S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. Pharmacological Research. (58) 2: 165-171, 2008.

SCHLEMPER V. Antispasmodic effects of hydroalcooholic extract of Marrubium vulgare on isolates tissues. Phytomedicine. (3)2: 211-216, 1996.

SCULLY YC, GORSKY M, LOZADA-NUR F. Aphtous ulcerations. Dermatologic Therapy. (15): 185-205, 2002.

SILVA FM, HANNA AC, SOUZA AA, FILHO FA Z, CANHOTO OMF, MAGALHAES A. Integrative analysis based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of Bertholletia excelsa biomas residues: determination of ellagic acid derivates. Journal of the Brazilian Chemical Society. 30(4): 830- 836, 2019.

SEIDEL AC, FAGUNDES DJ, NOVO NF, JULIANO Y, MEISTER H, BAZOTTE B. Response of the lung after pneumonectomy in alloxan diabetic rats. Brazilian Archives of Biology and Technology. 46: 211–214, 2003.

SIEBEN PG. Composição fitoquímica de cascas de persea major (meisn.) l.e.kopp (lauraceae), desenvolvimento e avaliação preliminar de formas farmacêuticas para uso tópico. 89f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2012.

SIMÕES CMO et al. (Org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ªed. Porto Alegre: Editora UFRGS e UFSC, 2007.

SIMOES CAGG, CONDE NC, VENANCIO GN, MILERIO OS, BANDEIRA MF, da VEIGA JUNIOR VF. Antibacterial activity of Copaiba oil gel on dental biofilm. The Open Dentistry Journal. (10): 2016.

SINHA S, VOHORA D. Drug and Discovery and Development: An Overview. Pharmaceutical Medicine and Translational Clinical Research. 19-32, 2018.

SKIRYCZ A, KIERSZNIOWSKA S, MERET M, WILLMITZER L, TZOTZOS G. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern Eldorado. Trends in biotechnology. 34(10): 781-190, 2016.

SMIGIEL KS, PARKS WC. Macrophages, Wound Healing, and Fibrosis: recent insights. Current Rheumatology Reports. 20 (4): 2018.

SOARES JA, de BARROS M, GONÇALEZ WP, CRISCI AR, JORGE MHS. Avaliação cicatrizante da Caesalpinia ferrea ex. TUL. var ferrea e da Aloe vera (L.) Burn f. em lesões cutâneas totais em ratos. Pers. Online: biol. & saúde. 11(3): 33-42, 2013.

SBD. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. São Paulo: AC Farmacêutica; 2020

SOUZA LAG, SILVA MF, MOREIRA FMS. Associações rizóbios-arbóreas na Amazônia. In: NODA H., SOUZA L.A.G, FONSECA O.J.M. Duas décadas de contribuições do INPA à pesquisa agronômica no trópico úmido. 193-219, 1997.

SOUZA TP, COSTA LM, SIMPLICIO FG. *Libidibia ferrea* (Mart. Ex tul) L.P. queiroz var. ferrea: pharmacological phytochemical and botanical aspects. Int J Pharm Pharm Sci. (7)4: 48-53, 2015.

SOUZA GB. Formulário farmacêutico magistral. 1.ed. São Paulo: Medfarma, 2016.

SPAGOLLA LC, SANTOS MM, AGUIAR C, PASSOS LML. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo "Rabbiteye" (Vaccinium ashei) e sua atividade antioxidante. Rev Ciênc Farm Básica Apl. (30)2: 59-64, 2009.

SPRENGER RF, CASS QB. Characterization of four Phyllanthus species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1291: 97-103, 2013.

TAGLIARI MP, STULZER HK, KELMANN RG, KUMINEK F, SILVA MAS. Estabilidade térmica e compatibilidade da hidroquinona. Cosmet Toilet, (20): 50-53, 2008.

TAGLIARI E, CAMPOS LF, CAMPOS AC, COSTA CASAGRANDE TA, NORONHA L. Efeito da administração oral de probióticos na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva. 32(3): 2019.

TEÓFILO CR. *et al*. Mast Cells and Blood Vessels Profile in Oral Carcinogenesis: an immunohistochemistry study. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. (21) 4: 1097-1102, 2020.

TOLEDO ACO, HIRATA LL, BUFFON MCM, MIGUEL MD, MIGUEL OG. Fitoterápicos: uma abordagem farmacoténica. Rev Lecta. 21(1/2): 7-13, 2003.

TOPAN JF. Emulsões à base de óleo de girassol (Helianthus annus L.) com cristal líquido: avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética. Ribeirão Preto, 2012.

UEDA H, TACHIBANA Y, MORIYASSU M, KAWANISHI K, ALVES SM. Aldose reductase inhibitors from the fruits of Caesalpinia ferrea Mart. Phytomedicina. (8)5: 377- 381, 2011.

VAILLANT L, SAMIMI M. Aphtes et ulcérations buccales. Presse med. 2016.

VASCONCELOS PCP, ANDREO MA, VILEGAS W, HIRUMA-LIMA CA, PELLIZZON CH. Effect of Mouriri pusa tannins and flavonoids on prevetion and treatment against experimental gastric ulcer. Journal of Ethnopharmacology. (131)1: 146-153, 2010.

VELNAR T, BAILEY T, SMRKOLJ V. The wound healing process: an oberview of the cellular and molecular mechanisms. J Int Med Res. 37(5): 1528-42, 2009.

VENANCIO GN, RODRIGUES IC, SOUZA TP, MARREIRO RO, BANDEIRA MFCL, CONDE NCO. Herbal mouthwash based on Libidibia ferrea: micorbiological control, sensory characteristics, sedimentation, pH and density. Rev Odontol UNESP. 44(2): 118- 124, 2015.

VIEIRA S. Bioestatística: tópicos avançados. 2. Ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2004.

VIEIRA DR, AMARAL FM, MACIEL MC, NASCIMENTO FR, LIBERIO AS, RODRIGUES VP. Plant species used in dental diseases: ethnopharmacology aspects and antimicrobial activity evaluation. J Ethnopharmacol. 155: 1441-1449, 2014.

VIEIRA CPB, ARAÚJO TME. Prevalência e fatores associados a feridas crônicas em idosos na atenção básica. Revista da Escola de Enfermagem da USP. 52: 2018; 52.

VIEIRA DB, GAMARRA LF. Avanços na tulização de nanocarreadores no tratamento e no diagnóstico de câncer. Einstein. (14)1: 99-103, 2016.

VILLANOVA JCO, ÓREFICE RL, CUNHA AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. Ciência e Tecnologia. (20)1: 51-64, 2010.

WHO (Word Health Organization). Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Geneva, 2005.

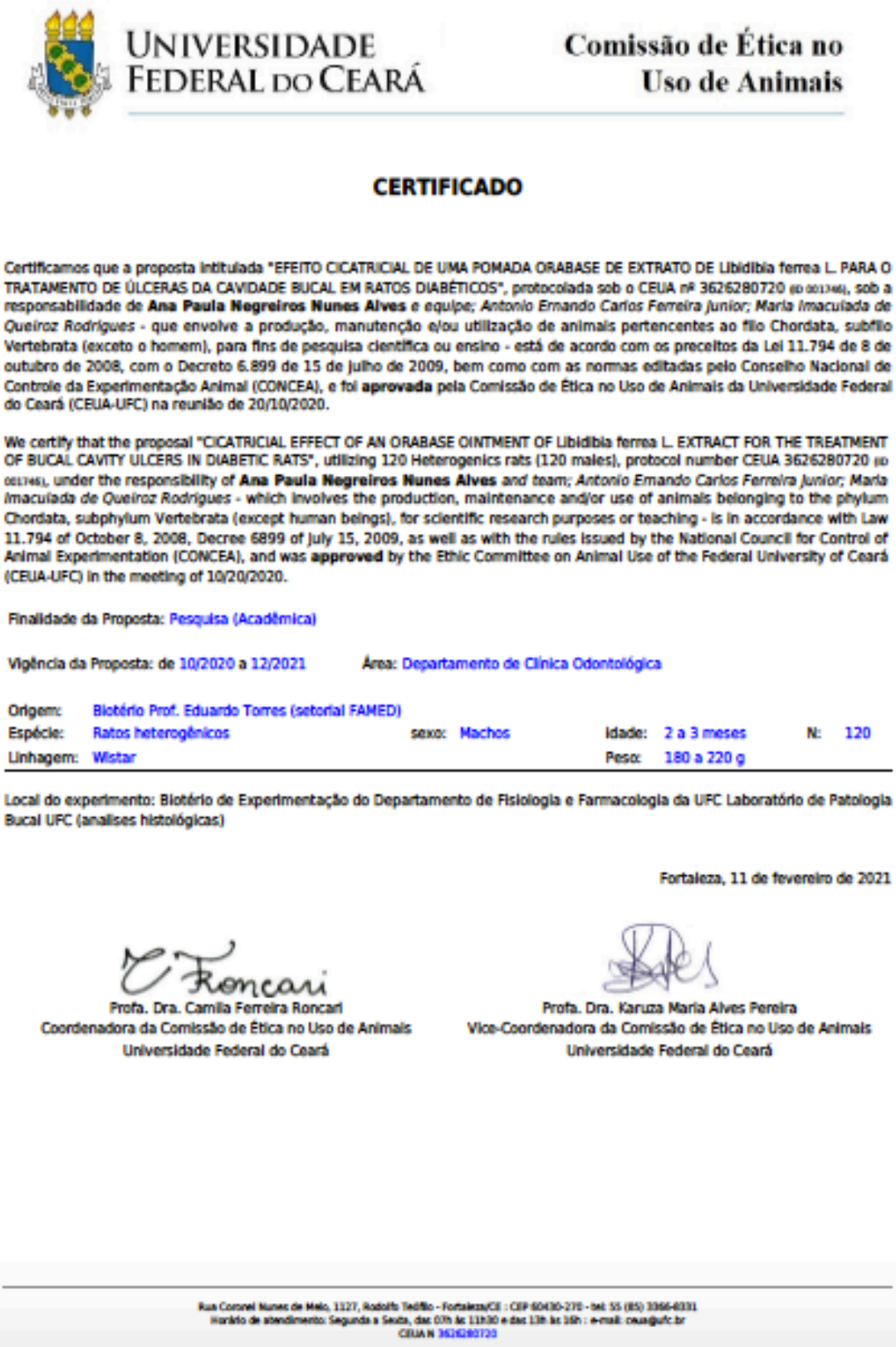
WILKINSON HN, HARDMAN MJ. Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. Open Biol. 10: 200223, 2020.

YU P, WANG Z, SUN X, CHEN X, ZENG S, CHEN L, LI S. Hydrogen-rich medium protects human skin fibroblasts from high glucose or mannitol induced oxidative damage. Biochemical and Biophysical Research Communications. 409: 350–355, 2011.

ZUNT SL. Recurrent Aphtous Stomatitis. Dermatol Clin. Jan. 21 (1):33-39, 2003.

ANEXO A

Figura 75. Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFC.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO CICATRICIAL DE UMA POMADA ORABASE DE EXTRATO DE Libidibia ferrea L. PARA O TRATAMENTO DE ÚLCERAS DA CAVIDADE BUCAL EM RATOS DIABÉTICOS", protocolada sob o CEUA nº 3626280720 (ID 0013746), sob a responsabilidade de **Ana Paula Negreiros Nunes Alves** *e equipe; Antonio Ernando Carlos Ferreira Junior; Maria Imaculada de Queiroz Rodrigues* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 20/10/2020.

We certify that the proposal "CICATRICIAL EFFECT OF AN ORABASE OINTMENT OF Libidibia ferrea L. EXTRACT FOR THE TREATMENT OF BUCAL CAVITY ULCERS IN DIABETIC RATS", utilizing 120 Heterogenics rats (120 males), protocol number CEUA 3626280720 (ID 0013746), under the responsibility of **Ana Paula Negreiros Nunes Alves** *and team; Antonio Ernando Carlos Ferreira Junior; Maria Imaculada de Queiroz Rodrigues* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 10/20/2020.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2020 a 12/2021 Área: Departamento de Clínica Odontológica

Origem:	Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)				
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	Idade:	2 a 3 meses	N: 120
Linhagem:	Wistar		Peso:	180 a 220 g	

Local do experimento: Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC Laboratório de Patologia Bucal UFC (analises histológicas)

Fortaleza, 11 de fevereiro de 2021

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Rua Coronel Nunes de Melo, 1127, Rodolfo Teófilo - Fortaleza/CE : CEP 60430-270 - tel: 55 (85) 3366-8331
Horário de atendimento: Segunda a Sexta, das 07h às 11h30 e das 13h às 16h : e-mail: ceua@ufc.br
CEUA N 3626280720