



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**“CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO E EFEITO
CICATRIZANTE DE UMA POMADA ORABASE DE
EXTRATO *Libidibia ferrea* L. PARA TRATAMENTO DE
ÚLCERAS DA CAVIDADE BUCAL.”**

Mestranda: LUCIANA ALEIXO DOS SANTOS DE MELO

MANAUS - AM

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

LUCIANA ALEIXO DOS SANTOS DE MELO

**“CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO E EFEITO
CICATRIZANTE DE UMA POMADA ORABASE DE
EXTRATO *Libidibia ferrea* L. PARA TRATAMENTO DE
ÚLCERAS DA CAVIDADE BUCAL.”**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Odontologia da Universidade
Federal do Amazonas, como
requisito para obtenção do título
de Mestre em Ciências
Odontológicas, fitoterapia em
odontologia.

**Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Fulgência Costa Lima Bandeira**

MANAUS – AM

2019

LUCIANA ALEIXO DOS SANTOS DE MELO

**“CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO E EFEITO
CICATRIZANTE DE UMA POMADA ORABASE DE *Libidibia
ferrea* L. PARA TRATAMENTO DE ÚLCERAS DA CAVIDADE
BUCAL.”**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, 12 de Junho de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Nikeila Chacon de Oliveira Conde
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

Prof. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

Prof. Dra. Karen Regina Carim da Costa
Universidade Federal do Amazonas – Manaus/AM

DEDICATÓRIA

À minha linda filha Cecília Aleixo,
espero ser sua luz e sua inspiração
para todo sempre.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus, por toda benção recebida até aqui em minha vida, sem sua proteção e graça tenho a certeza que nenhuma vitória seria possível.

À minha família, em especial aos meus pais Sandra Aleixo e Wesley Fazzioni, a madrinha-mãe Therezinha de Jesus Aleixo e minha tia Leonor Bernadete, sem o carinho, amor e apoio incondicional de todos, esta vitória seria inalcançável. Agradeço imensamente por vocês acreditarem no meu potencial, e, muitas vezes colocarem de lado suas prioridades para sonharem o meu sonho. A batalha foi árdua, porém a vitória com toda certeza é nossa.

Ao meu grande amigo Anselmo Matos, obrigada por todo apoio e incentivo nesses anos como colegas de docência, saiba que você é uma peça fundamental nesse meu contínuo crescimento profissional. Eu tenho muito orgulho de você e me sinto honrada em ser sua amiga, amo você e conte comigo sempre.

Aos meus colegas de trabalho que me apoiaram direto ou indiretamente, em especial ao Prof. Fernando Gonçalves, por sua amizade e apoio, ao Dr. Tadeu Borges pelas palavras de incentivo e por acreditar no meu potencial e a todo apoio dado durante esta etapa.

À minha amada orientadora de mestrado profa. Dra. Nikeila Conde por ser uma pessoa maravilhosa e de incrível competência. Obrigada pelo carinho, amizade, apoio e compreensão e por acreditar em minha capacidade e trabalho, confiando a mim a honra de poder aprender cada vez mais ao seu lado. Que possamos ter imensas oportunidades de trabalharmos lado a lado, ficarás guardada com carinho para sempre em meu coração.

À minha querida co-orientadora de mestrado profa. Dra. Maria Fulgência por ser esta profissional de incrível competência. Agradeço toda confiança em meu trabalho e por poder aprender muito ao seu lado. Espero, ainda, termos outras grandes oportunidades para troca de conhecimento e trabalho, és uma grande inspiração.

À minha querida amiga que o mestrado me concedeu, Keily Melo, por seu carinho e amizade em todo este caminho.

Ao Dr. Felipe Massa, por todo apoio durante as análises cromatográficas, sempre muito solícito e prestativo, grata demais por toda sua ajuda.

À equipe da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF - UFAM), por todo auxílio durante o preparo do extrato, em especial a Dra. Tatiane Pereira.

À equipe da Universidade Federal do Ceará (UFC), principalmente a Dr. Ana Paula e ao Doutorando Ernando, onde eu aprendi muito e sou muito grata durante toda ajuda no experimento, sem o apoio da equipe este trabalho não se tornaria possível.

À coordenação e todos os professores do Programa de Pós-Graduação (PPGo), Universidade Federal do Amazonas - UFAM, em especial à profa. Carina Toda, pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados. Bem como aos alunos de graduação, pós-graduação e funcionários com quem pude compartilhar sorrisos a cada dia.

À CAPES pelo apoio e incentivo financeiro neste projeto.

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

RESUMO

As úlceras aftosas recorrentes e traumáticas constituem uma patologia bastante comum na odontologia, porém os tratamentos instituídos nem sempre alcançam o sucesso esperado. Dentro da fitoterapia, a *Libidibia ferrea* L., conhecida como jucá ou pau-ferro, é bastante utilizada por apresentar propriedades terapêuticas cicatrizantes, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi realizar o controle de qualidade físico-químico e avaliar o efeito cicatricial de uma pomada orabase a base de *Libidibia ferrea* L. a 2% em úlceras orais induzidas em ratos. No estudo 1, “*in vitro*” foram realizados os testes de centrifugação, pH, densidade, comportamento reológico e controle microbiológico pela determinação de contaminantes/patógenos, caracteres organolépticos e análise do perfil fitoquímico em HPLC em três condições de armazenamento, nos períodos experimentais de 0, 30 e 60 dias. No estudo 2, “*in vivo*” foi avaliado a ação cicatrizante da pomada em úlceras induzidas na mucosa bucal de ratos, onde os animais foram divididos em 3 grupos: controle positivo (tratamento com a pomada acetônida de triancinolona), controle orabase (tratados somente com a orabase) e grupo teste (utilizando a pomada de *L. ferrea* L. a 2%), e avaliados nos dias 1, 5 e 10 dias pós indução ulcerativa. No teste centrifugação, observou-se a separação de 1 fase em todos os ambientes de armazenamento e tempos testados; no teste do pH, a formulação manteve-se estável (pH entre 6,01 a 6,67); para avaliação do comportamento reológico as mesmas mantiveram-se constantes; na avaliação de contaminantes não houve crescimento em todas condições testadas. As amostras apresentaram coloração amarronzada clara (Tâmara), odor forte e aromático, com presença de brilho e consistência lisa, ausente de granulações nas condições testadas. Em relação ao diâmetro das úlceras, o grupo controle positivo não demonstrou diferença significativa entre os tempos testados ($p=0,994$). Já na comparação intergrupos, na análise do dia 5, os diâmetros das úlceras do grupo Jucá foram significativamente menores em comparação aos demais grupos ($p=0,005$). Quanto ao padrão histológico, apenas no dia 10 houve diferenças significativas ($p=0,002$), com o grupo teste (score 0) orabase (score 1) e positivo (score 3). Em relação ao peso dos animais, todos os grupos aumentaram ou mantiveram o peso ao final do período de dez dias de experimento. Pode-se concluir que a são três os compostos majoritários da solução analisada: ácido gálico, ácido elágico e rutina. A formulação testada apresentou estabilidade físico-química em todos os tempos e condições de armazenamento, sem alteração de cor, odor e consistência, elevada viscosidade e ausência de contaminantes bacterianos e/ou fúngicos. Assim como, houve redução significativa das úlceras tratadas com a pomada orabase de *L. ferrea* L. a 2% quando comparada aos demais grupos, comprovando a atividade cicatricial da formulação fitoterápica proposta quando utilizada para tratamento de úlceras bucais.

Palavras-chaves: Cicatrização; Fitoterapia; Úlceras orais; *Libidibia ferrea*.

ABSTRACT

Recurrent and traumatic aphthous ulcers are a common pathology in dentistry, but the treatments instituted do not always reach the expected success. Within the herbal medicine, *Libidibia ferrea* L., known as jucá or pau-ferro, is widely used because it presents healing, anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial therapeutic properties. The objective of this study was to perform the physical-chemical quality control and to evaluate the cicatricial effect of a 2% *Libidibia ferrea* L. orabase ointment on oral ulcers induced in rats. In study 1, the centrifugation, pH, density, rheological behavior and microbiological control tests were carried out by determination of contaminants/pathogens, organoleptic characteristics and phytochemical profile analysis in HPLC under three storage conditions in the experimental periods of 0, 30 and 60 days. In study 2, the healing action of the ointment was evaluated in ulcers induced in the oral mucosa of rats, in which the animals were divided into 3 groups: positive control (treatment with triamcinolone acetonide ointment), orabase control (treated only with orabase) and test group (using 2% *L. ferrea* L. ointment) and evaluated on days 1, 5 and 10 days post ulcerative induction. In the centrifugation test, 1-phase separation was observed in all storage environments and times tested; in the pH test, the formulation remained stable (pH 6.01 to 6.67); for evaluation of the rheological behavior they remained constant; in the evaluation of contaminants there was no growth in all tested conditions. The samples showed light brownish hue (Tâmara), strong and aromatic odor, with presence of brightness and smooth consistency, absent of granulations under the tested conditions. Regarding the diameter of the ulcers, the positive control group showed no significant difference among the times tested ($p = 0.994$). In the intergroup comparison, in the analysis of day 5, the diameters of the ulcers of the Jucá group were significantly lower in comparison to the other groups ($p = 0.005$). As for the histological pattern, only on day 10 there were significant differences ($p = 0.002$), with the test group (score 0) orabase (score 1) and positive (score 3). Regarding the weight of the animals, all groups increased or maintained their weight at the end of the ten day experiment period. It can be concluded that three major compounds of the solution analyzed are gallic acid, ellagic acid and rutin. The tested formulation presented physical-chemical stability at all times and storage conditions, with no alteration of color, odor and consistency, high viscosity and absence of bacterial/fungal contaminants. As well, there was a significant reduction of ulcers treated with ointment orabase of *L. ferrea* L. to 2% when compared to the other groups, proving the cicatricial activity of the phytotherapeutic formulation proposed when used for the treatment of oral ulcers.

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação das úlceras. -----	22
Figura 2 – Representação esquemática do desenho do estudo. -----	38
Figura 3 – Árvore de <i>L. ferrea</i> L. -----	39
Figura 4 – Secagem em temperatura ambiente. -----	39
Figura 5 – Estufa de ar circulante. -----	40
Figura 6 – Moinho de facas. -----	40
Figura 7 – MPV. -----	40
Figura 8 – Pesagem do extrato bruto. -----	41
Figura 9 – Água/Etanol. -----	41
Figura 10 – Decoctor. -----	41
Figura 11a e 11b – Filtragem. -----	41
Figura 12 – Aparelho Spray Dryer. -----	41
Figura 13 – Extrato. -----	41
Figura 14 – Rendimento do extrato seco. -----	41
Figura 15a e 15b – Componentes da pomada orabase de <i>L. ferrea</i> L. a 2%. -----	43
Figura 16 a e 16b – Aquecimento em banho-maria até atingir 60°. -----	43
Figura 17 – Pomada orabase de <i>L. ferrea</i> L. a 2%. -----	44
Figura 18 – Pomada orabase. -----	44
Figura 19 – Pomada orabase (5g). -----	45
Figura 20 – Centrifugação. -----	45
Figura 21 – Solução de calibração 4,0. -----	46
Figura 22 – Solução de calibração 7,0. -----	46
Figura 23 – Aferição do pH da pomada. -----	46
Figura 24 – Picnômetro vazio. -----	47
Figura 25 – Picnômetro água. -----	47
Figura 26 – Picnômetro cheio. -----	47
Figura 27 – Viscosímetro de Brookfield. -----	50
Figura 28 – Spindle 2. -----	50
Figura 29 – Grupos de estudos acondicionados em suas respectivas caixas. -----	51
Figura 30 – Caixa de acondicionamento. -----	52
Figura 31 – Pesagem dos animais. -----	52

Figura 32 – Relaxante muscular e anestésico.	53
Figura 33 – Anestesia dos animais.	53
Figura 34 – Caixa de acondicionamento (instrumentais).	53
Figura 35 – Indução ulcerativa.	53
Figura 36 – Úlcera induzida em mucosa jugal - lado esquerdo.	54
Figura 37 – Mensuração com paquímetro digital.	54
Figura 38, 39 e 40 - Aplicação dos agentes testes: pomada orabase de jucá, somente a orabase e pomada Acetonida de triancinolona, respectivamente.	55
Figura 41 – Remoção do fragmento.	56
Figura 42 – Fixação em formol a 10%.	56
Figura 43 – Bloco de parafina.	57
Figura 44 – Solidificação do bloco de parafina.	57
Figura 45a – Micrótomo.	57
Figura 45b – Incorporação do corte em lâmina.	57
Figura 46 – Coloração Hematoxilina-eosina das lâminas histológicas.	57
Figura 47 – Área de acondicionamento das gaiolas.	57
Figura 48 - Perfil Fitoquímico do extrato seco da casca do caule de <i>L.ferrea</i> L.	59
Figura 49 - Teste de centrifugação da pomada com separação de fases (tempo 0).	59
Figura 50 (a, b e c) – Aspecto visual das amostras após teste de centrifugação demonstrando separação de fase (tempo 30).	60
Figura 51 (a, b e c) – Aspecto visual das amostras após teste de centrifugação demonstrando separação de fase (tempo 60).	60
Figura 52 e 53 - Controle microbiológico tempo 0 – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose, respectivamente.	62
Figura 54, 55 e 56 - Controle microbiológico tempo 0 – ágar macconkey, ágar cetrimida e ágar sal manitol.	62
Figura 57 e 58 – Controle microbiológico tempo 30 (Geladeira – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose.	63
Figura 59 e 60 - Controle microbiológico tempo 30 (TAC) – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose.	63
Figura 61 e 62 - Controle microbiológico tempo 30 (TAE) – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose.	63
Figura 63 – Controle microbiológico 30 (TAC, TAE e Geladeira) – ágar MacConkey.	64
Figura 64 – Controle microbiológico 30 (TAC, TAE e Geladeira) – ágar Cetrimida.	64

Figura 65 – Controle microbiológico 30 (Geladeira, TAE e TAC) – ágar Sal Manitol. -----	64
Figura 66 – Controle microbiológico tempo 60 (Geladeira) – ágar caseína-soja e ágar Saboraud-dextrose. -----	65
Figura 67 – Controle microbiológico tempo 60 (TAC) – ágar caseína-soja e ágar Saboraud-dextrose. -----	65
Figura 68 – Controle microbiológico tempo 60 (TAE) – ágar caseína-soja e ágar Saboraud-dextrose. -----	65
Figura 69 – Controle microbiológico 60 (TAE, Geladeira e TAC) – ágar MacConkey. -----	66
Figura 70 - Controle microbiológico tempo 60 (Geladeira, TAE e TAC) – ágar Cetrimida e Sal Manitol. -----	66
Figura 71 – Determinação da cor através da escala de cor Coral®. -----	68
Figura 72 – Aspecto visual da pomada orabase de <i>L. ferrea</i> L. de consistência lisa e brilhante, ausente de granulações. -----	68
Figura 73 - Representação clínica das úlceras orais tratadas com Orabase, Extrato de Jucá e Omcilon nos dias 01, 05 e 10. -----	69
Figura 74 - Escores histológicos de úlceras traumáticas orais tratados com Oncilom, Orabase e Jucá nos dias 1,5 e 10. H&E. Aumento 200x. -----	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Esquema para pesquisa de número total de microrganismos. -----	48
Esquema 2 - Esquema para pesquisa de <i>Escherichia coli</i> . -----	48
Esquema 3 - Esquema para pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . -----	49
Esquema 4 – Esquema para pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> . -----	49
Esquema 5 – Linha do tempo do estudo “ <i>in vivo</i> ” experimental. -----	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação da mediana do pH em relação aos grupos em 30 e 60 dias, Manaus - AM.	63
Gráfico 2 - Comparação dos diâmetros da lesão em relação aos grupos nos diferentes dias, Manaus - AM.	72
Gráfico 3 – Comparação dos pesos em relação aos grupos em três diferentes momentos, Manaus - AM.	72
Gráfico 4 - Comparação dos escores em relação aos grupos nos diferentes dias.	73

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 – Componentes da pomada orabase. -----	42
Quadro 2 - Diâmetro médio das úlceras orais nos dias 01 ,05 e 10. (Média± EPM/ Teste de Kruskal-wallis/ Pos teste de Dunn. -----	71
Tabela 1 - Parâmetros histológicos. -----	58
Tabela 2 - Valores de pH após a formulação da pomada (T0), após 30 (T30) e 60 dias (T60) nos diferentes ambientes. -----	63
Tabela 3 - Comparação da mediana da viscosidade em relação aos grupos em 30 e 60 dias conforme as rotações, Manaus - AM. -----	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

et al.: e outros (abrev. de “et ali”).

DEF: Dicionário de Especialidades Farmacêuticas.

MEC: Matriz extracelular.

L. Ferrea L.: Libidibia Ferrea Linné.

pH: potencial hidrogeniônico.

Ssp: species pluralis.

S. sanguinis: *Streptococcus sanguinis*.

S. salivarius: *Streptococcus salivarius*.

S. mitis: *Streptococcus mitis*.

S.mutans: *Streptococcus mutans*.

S.sobrinus: *Streptococcus sobrinus*.

L.casei: *Lactobacillus casei*.

C.albicans: *Candida albicans*.

S.oralis: *Streptococcus oralis*.

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

INPA: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

UFAM: Universidade Federal do Amazonas.

FCF: Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

TAC: temperatura ambiente claro.

TAE: temperatura ambiente escuro.

G: geladeira.

°C: graus celsius.

%: porcentagem

CMC: caboximetilcelulose.

a.C.: antes de cristo.

mg: miligramas.

g: gramas.

Kg: Kilogramas.

µl: microlitros.

µm: micromêtro.

Mm: milímetros.

Cm: centímetros.

m/v: massa/volume.

q.s.p.: quantidade suficiente para.

UR: Unidade Relativa.

CIM: concentração inibitória mínima.

EP: extrato puro.

RPM: rotação por minute.

UFC: unidade formadora de colônias.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

BHI: brain heart infusion.

MPV: Matéria prima vegetal.

Nº: número.

RENISUS: Relação Nacional de Plantas Medicinais do SUS.

Res.: Resolução.

PNPIC: Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares.

AM: Amazonas.

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada.

BPMF: Boas Práticas de Manipulação Farmacêutica.

ANOVA: Análise de variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	Lesões ulcerativas da cavidade bucal	22
2.2	Plantas medicinais e fitoterapia	25
2.3	<i>Libidibia ferrea</i> L.	28
2.4	Desenvolvimento tecnológico farmacêutico	30
2.5	Controle de qualidade de produtos fitoterápicos	32
3.	OBJETIVOS	37
3.1	Geral	37
3.2	Específicos	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Desenho de estudo e consentimento para pesquisa	38
4.2	Coleta do material vegetal (<i>L. ferrea</i> L.)	39
4.3	Obtenção do extrato (<i>L. ferrea</i> L.)	40
4.4	Rendimento do extrato seco	41
4.5	Perfil fitoquímico do extrato seco de <i>Libidibia ferrea</i> L.	42
4.6	Preparo da pomada orabase (<i>L. ferrea</i> L.)	42
4.7	Caracterização da pomada	44
4.7.1	Testes físico-químicos do controle de qualidade	45
4.7.1.1	Teste de centrifugação	45
4.7.1.2	Teste de determinação do pH aparente	45
4.7.1.3	Determinação da densidade de massa e da densidade relativa	46
4.7.1.4	Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes – Controle microbiológico da pomada de <i>Libidibia ferrea</i> L.	47
4.7.2	Comportamento reológico	49
4.7.3	Avaliação dos caracteres organolépticos	50
4.8	Teste da atividade cicatricial em mucosa jugal de ratos	51
4.8.1	Indução da ulceração	52
4.8.2	Avaliação clínica	54
4.8.3	Avaliação da diferença de peso corpóreo	55
4.8.4	Aplicação dos fármacos	55

4.8.5	Análise Histológica	56
4.8.6	Condições de alojamento e alimentação dos animais	59
4.8.7	Método de indução de morte e descarte da carcaça	59
4.9	Análise estatística	59
5	RESULTADOS	61
5.1	Perfil fitoquímico do extrato seco de <i>Libidibia ferrea</i> L.	61
5.2	Teste de centrifugação	61
5.3	Teste de determinação do pH aparente	62
5.4	Determinação da densidade de massa e densidade relativa	63
5.5	Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes – controle microbiológico da pomada de <i>Libidibia ferrea</i> L.	64
5.6	Comportamento reológico	68
5.7	Avaliação dos caracteres organolépticos	69
5.8	Teste de atividade cicatricial em mucosa jugal de ratos	70
5.8.1	Diâmetro ulcerativo	70
5.8.2	Variação do peso corpóreo	72
5.8.3	Escores histológicos	73
6	DISCUSSÃO	76
7	CONCLUSÃO	82
8	REFERÊNCIAS	83
9	ANEXOS	94
9.1	Anexo A – aprovação pelo CEUA/UFAM	94
9.2	Anexo B – aprovação pelo CEUA/UFC	95
9.3	Anexo C – descrição referente ao parâmetro histológico	96

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia é um método de tratamento de enfermidades que utiliza drogas vegetais: planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica. É caracterizada como o uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas desde que sua eficácia e segurança sejam validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas para garantir sua adequada reprodutibilidade e garantir a qualidade do produto farmacêutico (ANVISA, 2013).

O uso de plantas medicinais faz parte da prática da medicina popular, constituindo um conjunto de saberes internalizados nos diversos usuários e praticantes, especialmente pela tradição oral. Esta prática diminuiu frente ao processo de industrialização ocorrido no país, nas décadas de 1940 e 1950. Atualmente, observa-se um resgate na utilização de fitoterápicos pela população brasileira e mundial. Dois fatores podem explicar este aumento: o primeiro seria os avanços ocorridos na área científica que permitiu o desenvolvimento de fitoterápicos reconhecidamente seguros e eficazes, e o segundo fator, é a crescente tendência de busca, pela população, por terapias menos agressivas destinadas ao atendimento primário à saúde. Os programas de fitoterapia empregados no Brasil, principalmente na atenção primária, vem trazendo à população novas opções terapêuticas visando suprir carências medicamentosas aos tratamentos locais e sistêmicos (BRAGANÇA, 1996; BRUNING, 2012; ELDIN & DUNFORD, 2001; IBIAPINA *et al.*, 2014; YUNES *et al.*, 2001).

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, que em estado natural, ou após sofrerem processos de transformação química, possuíam atividade farmacológica, muitas vezes, já confirmadas pelo uso popular e comprovadas cientificamente, passaram a gerar interesse e incentivos institucionais e governamentais (COPETTI & GRIEBELER, 2005).

Ao longo da história, as plantas têm servido como reservatório de potenciais novos fármacos. No entanto, Allen Jr, Poppvich e Ansel (2007) afirmam que apesar das espécies já exploradas, elas representem pequena porção de 270.000 vegetais conhecidos no qual tem sido estudado quanto à atividade terapêutica.

O controle de qualidade de um produto envolve várias etapas que vão desde a obtenção da matéria-prima, passando por todo o processo de produção, culminando com a análise do

produto final. Ainda se destaca que a qualidade da matéria-prima não garante a eficácia do produto, mas é fator determinante da mesma (FARIAS, 2001).

As plantas utilizadas na medicina popular com finalidades terapêuticas têm contribuído para obtenção de fármacos que ainda são utilizados na prática clínicas como a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

Na odontologia, tem havido um crescente interesse neste assunto nos últimos anos, demonstrada pelo aumento do número de estudos com produtos naturais na área. Esses estudos apontam que as plantas medicinais podem ser usadas terapeuticamente contra doenças bucais exibindo propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, analgésicas e anti-hemorragicas para o tratamento de odontalgias e outros distúrbios bucais (CASTILHO *et al.*, 2007; CONDE, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2010; LIMA-JÚNIOR & SOUZA, 2005).

A *ex Ceasalpinia ferrea* Mart. (*L. ferrea* L.) popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro, é bastante utilizada na medicina popular por apresentar propriedades terapêuticas antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana, o que justifica o grande interesse de pesquisadores por esta planta (PEREIRA *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2009).

As cascas em decocto combatem asma e tosse convulsivas, agindo ainda contra afecções broncopulmonares e no combate à diabetes, a sacarina, amenizando sintomas, poliúria e xerostomia. Tem ação cicatrizante, antiúlcera, hemostática, antidiabética, expectorante, anti-inflamatória, anti-helmíntica, antibacteriana, cardiônica (OLIVEIRA, 2008a; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As lesões ulcerativas presentes na cavidade oral, popularmente conhecidas como aftas, constituem uma patologia de etiologia desconhecida bastante comum na prática diária odontológica, têm uma incidência universal e seu conhecimento é obrigatório para todo cirurgião dentista. Apesar da etiologia desconhecida existem várias hipóteses etiológicas que são especuladas, como hereditariedade, traumas variados sobre a mucosa bucal, mediação por microrganismos (bactérias), alterações hematológicas, hormonais e psicológicas. Sendo assim, os tratamentos instituídos nem sempre alcançam o sucesso esperado. A prevalência epidemiológica abrange o sexo feminino em quase 90%, apresentando surtos esporádicos, com sintomatologia discreta à moderada o que se refere às ulcerações aftosas menores (MARCUCCI, 2005).

Quando se deseja tratar das lesões em mucosa oral, sejam elas envolvidas ou não com o sistema imunológico, dentre elas: as aftas traumáticas, lesões por lúpus eritematoso, pênfigo vulgar, liquens planos, dentre outras, tem sido escolhido preferencialmente o tratamento

paliativo pelo uso de pomadas a base de corticosteroides sintéticos (Acetonido de Triancinolona a 1%), geralmente em orabase (REGEZI, SCIUBBA & JORDAN, 2003).

Considerando a prevalência de lesões ulcerativas na cavidade oral e do desconforto que causam aos pacientes, prejudicando a mastigação, deglutição e a fonação, estudos à procura de novas formas de tratamento são necessários. Em vista da necessidade de novas formulações e de opções naturais para o tratamento de lesões ulceradas em cavidade bucal, a proposta desse trabalho foi caracterizar uma formulação magistral a base de fitoterápico, 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 Agência Nacional de Vigilância Sanitária, bem como avaliar a atividade cicatricial em úlceras induzidas na mucosa oral de ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Lesões ulcerativas da cavidade bucal

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

As lesões ulcerativas comumente presentes na cavidade oral são caracterizadas pela cessação da continuidade do tecido cutâneo-mucoso, 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 na Figura 1 (BRASIL, 2002).



Figura 1- Classificação das úlceras. Fonte: BRASIL, 2002.

Segundo Kignel (2007) as aftas, estomatites aftosas ou úlceras aftosas recorrentes é uma doença da cavidade bucal mais frequentes que se caracteriza por um desequilíbrio imunológico relacionado com linfócitos T de etiologia desconhecida, porém com diversos fatores predisponentes, sendo os fumantes mais acometidos. Em uma visão microscópica, observa-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 recobrimdo-a e consequente aumento dos infiltrados epiteliais; e, a última fase, de reparação, observa-se a regeneração do epitélio.

Certas lesões bucais 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. Segundo Brasileiro Filho (), estímulos mecânicos produz vários tipos de lesões (únicas ou múltiplas), denominadas de lesões ulcerativas traumáticas.

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, ovóides 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 10mm 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 (KIGNEL, 2007; SCULLY; GORSKY & LOZADA-NUR, 2002; ZUNT, 2003).

Ao analisar as características clínicas das lesões COMPILATO *et al.* (2009) relatou 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.

As lesões aftosas são normalmente encontradas em superfícies não queratinizadas, tais como a mucosa, bordos da língua e lábios, as quais podem ser facilmente lesionadas pela dentição. 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.*, 2009).

Assim que a superfície do epitélio é lesionada pode-se observar o início do processo de cicatrização sendo um processo natural mediado por uma organização dos tecidos onde o tecido afetado é substituído por tecido conjuntivo vascularizado. (BRASILEIRO FILHO, 1998).

Soares *et al.* (2013) analisou a atividade cicatrizante da *Ceasalpinia ferrea* e *Aloe vera* (L.) *Burn.f.* em lesões cutâneas totais provocadas experimentalmente em ratos da linhagem

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 mesmos após o 5º dia após a lesão induzida. Durante a análise histopatológica pode-se observar as diferenças de resultados entre os grupos, 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 *Ceasalpinia 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 *Ceasalpinia ferrea* e *Aloe vera* (L.) Burn.f. com diferença significativa entre os grupos tratados e controle, predominando um melhor resultado do grupo tratado com *Ceasalpinia 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%) foi realizada 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) constatou que a concentração pode influenciar no resultado do tratamento, pois a concentração a 12,5% mostrou-se superior a de 50% que retardou o processo de contração da ferida e apresentou menor grau de reepitelização, porém o extrato a 12,5% apesar de apresentar atividade cicatrizante não apresentou diferença estatística significativa em relação ao soro fisiológico. O extrato, nas doses testadas não demonstraram 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.

ALVES *et al.* (2011) estabeleceram um modelo experimental de úlcera traumática em mucosa jugal de ratos para utilização em futuros testes de terapias alternativas. 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 estes 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.

A escolha da terapêutica para úlceras aftosas recorrentes e traumáticas é inespecífica, baseia-se na gravidade, frequência, sintomatologia e promoção do processo cicatricial, utilizados na maioria das vezes opções terapêuticas paliativas como 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; HOSEINPOUR, 2011; KIGNEL *et al.*, 2007).

2.2. Plantas medicinais e Fitoterapia

Apesar do uso de produtos a base de plantas medicinais transcender 1500 a.C., 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 (IBIAPINA *et al.*, 2014; MACIEL *et al.*, 2002; OLIVEIRA; 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 (CALIXTO, 2005).

Os indícios sobre a prática da Fitoterapia 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). Índícios 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; ALONSO, 1998; NOGUEIRA, 1983).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA nº 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 compostos fitoterápicos podem ser utilizados nas mais variadas formas farmacêuticas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas 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 (FRANCISCO, 2010).

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 nº 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; 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 nº 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 (FRANCISCO, 2010).

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 (*Syzygium aromaticum*), Romã (*Punica granatum*), Tanchagem (*Plantago major* L.), Amoreira (*Morus celtidofilia*), 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 officinalis*, 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 recentes 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 (*Euterpe oleracea*) produz um evidenciador (corante) de placa dental com eficiência de 90% superior a produtos comercializados tais como o verde de malaquita, a fucsina e a eritrosina (FRANCISCO, 2010).

A odontologia perscruta agentes biocompatíveis para serem usados nos tecidos dentinários para os mais diversos fins medicamentosos, BANDEIRA *et al.* (2016) evidenciou a eficácia de uma emulsão de óleo de copaíba e uma suspensão do extrato de etanol de própolis como agentes de limpeza dentária.

SANTOS *et al.* (2009) comprovou a utilização de plantas medicinais para afecções da cavidade oral, sendo a romã (*Punica granatum* L.) a mais utilizadas por parte dos pacientes e profissionais corroborando com o estudo de Evangelista *et al.* (2013) que demonstrou 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 (*Arrabidaea chica*), além da planta, sem identificação botânica, conhecida popularmente como Sara tudo. 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 e colaboradores (2015) onde os profissionais da área da saúde necessitam de capacitação e motivação para prescrição adequada e segura de medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.

2.3. *Libidibia ferrea* L.

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* L., conhecida como jucaina, 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; 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; CARVALHO *et al.*, 1996; CAVALHEIRO *et al.*, 2009; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; MAIA, 2004).

Estudo preliminares sobre o perfil fitoquímicos 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 (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 (BALBACH, 1992; CARVALHO *et al.*, 1996). 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 (UEDA *et al.*, 2001).

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 estabilidade farmacológica 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.

2.4. Desenvolvimento tecnológico farmacêutico

O desenvolvimento de novas tecnologias farmacológicas traz novas opções de tratamento, bem como de formulações, aprimorando a prestabilidade 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 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 Brasil desenvolva pesquisa com plantas medicinais em escala mais expressiva, dentre elas podemos destacar a limitação política e legislativa, parcerias pública-privada e entre as indústrias e universidades (CARVALHO *et al.*, 2008).

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 procedência sanitária do material vegetal, sendo esta irregular, sobretudo com a contaminação microbiológica, além da presença de herbicidas e agrotóxicos. A implementação das políticas de Plantas Medicinais e Fitoterápicos em 2006, no Brasil, trouxe o incentivo ao desenvolvimento e pesquisa de novas plantas medicinais/fitoterápicos, com foco na nossa biodiversidade (TOLEDO *et al.*, 2003).

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, mesmo alguns industrializados foram resultantes de síntese 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 uma nova droga 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. Contudo, o desenvolvimento de um fitoterápico com comprovação de qualidade, segurança e eficácia demanda menos recursos e riscos (CALIXTO; SIQUEIRA JUNIOR, 2008).

A indústria farmacêutica é o setor que mais investe em pesquisa, desenvolvimento e inovação. No atual 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 compostos de ação sinérgica. O desenvolvimento do Acheflan® (Laboratório Aché), produzido a partir da planta *Cordia verbenácea*, 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, podemos destacar o ácido acetil salicílico, identificado no extrato vegetal da *Salix alba*, a *Aloe vera*, conhecida por diversas propriedades terapêuticas dentre elas purgativas, revulsivante, imunorreguladora, entre outras.

Os produtos farmacêuticos atuais estão longe do ótimo desempenho 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 desenvolvidos para promover 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 específicas 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 biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de serem não tóxicas e não imunogênicas, as mesmas são intensivamente estudadas para carreamento e a liberação de diversas drogas anticancerígenas, como o Abraxane® utilizado para veiculação de quimioterápicos para o tratamento de diversos tipos de cânceres. Os carreadores anfífilicos também possuem propriedades biológicas de isolamento do princípio ativo do meio circundante, evitando sua degradação, bem como a capacidade de carrear drogas hidrofílicas e hidrofóbicas (ALLEN; CURRIS, 2004; VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Outra proficuidade dos fármacos nanoparticulados é que eles não são capazes de atravessar tecidos saudáveis, somente tecidos inflamados ou acometidos por tumores, efeito conhecido como *Enhanced Permeability and Retention* (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 drogas via bucal tem algumas vantagens bem conhecidas sobre a distribuição de fármacos, a mucosa oral por ser bem permeável e suprida de vasos sanguíneos, as drogas são prontamente absorvidas 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).

Por fim, cada produto inovador deve seguir um processo adequado para garantir a segurança e eficácia antes de sua comercialização. Berkowitz (2006) e Guido e colaboradores (2010) descreveram simplificada 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, 2010; BRASIL, 2013; COSTA; GUIMARAES; VIEIRA, 2014; WHO, 1998).

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 pré-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 (BRANDÃO; FREIRE, VIANNA-SOARES, 1998; SIMÕES *et al.*, 2007), a aplicação e a validação de métodos analíticos para matérias-primas a base de plantas ainda são escassas na literatura porém de ser realizada de acordo com as bases científicas e técnicas (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os parâmetros de qualidade são estabelecidos nas Farmacopéias e Códigos oficiais, atualmente 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. Porém com avanços tecnológicos a maioria se tornou atrasada para fins analíticos (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 nº67 de 2007 (BRASIL, 2007), onde o controle de qualidade é ferramenta indispensável para sua verificação, para atingir um produto com qualidade farmacopéia e que possa ser manipulado quantas vezes for necessário, com os mesmos parâmetros de qualidade.

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, 2010a).

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.

A avaliação de Produtos Tradicionais Fitoterápicos 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 RDC 13/2013 (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 diversas 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 (CHECHINEL-FILHO, 1998; MATOS, 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 (BYRNE, 1993; CHECHINEL-FILHO, 1998; SIMÕES *et al.*, 2007).

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); 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).

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 40° 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.

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 30°C 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. Este estudo deve ser realizado a cada doze meses (BRASIL, 2005).

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 quando 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.

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, por meio de estudos laboratoriais e clínicos específicos (GEBARA *et al.*,1996).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar o controle de qualidade físico-químico e avaliar o efeito cicatricial de uma pomada orabase a base de *Libidibia ferrea* L. a 2% em úlceras orais induzidas em ratos.

3.2 Específicos

- ✓ Determinar os compostos químicos majoritários através do controle analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);
- ✓ Avaliar a estabilidade da fórmula farmacêutica, bem como as propriedades físico-químicas de controle de qualidade (densidade, pH, centrifugação e características organolépticas), bem como verificar a presença de contaminantes bacterianos e/ou fúngicos, obedecendo às orientações de padronização e normas das boas práticas de fabricação de uma formulação terapêutica fitoterápica em tempos e condições de armazenamento pré-estabelecidos;
- ✓ Avaliar a ação cicatrizante da formulação fitoterápica em orabase em úlceras induzidas na mucosa oral de ratos da linha *wistar*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenho do estudo e consentimento para pesquisa

A presente pesquisa teve caráter quantitativo e qualitativo, descritiva, experimental, dividido em duas etapas: a primeira etapa foi um estudo “*in vitro*” controlado, e, a segunda etapa, um estudo “*in vivo*” em um modelo experimental de úlceras traumáticas em mucosa jugal de ratos seguindo a metodologia proposta por Alves *et al.* (2011), como descrito na Figura 2.

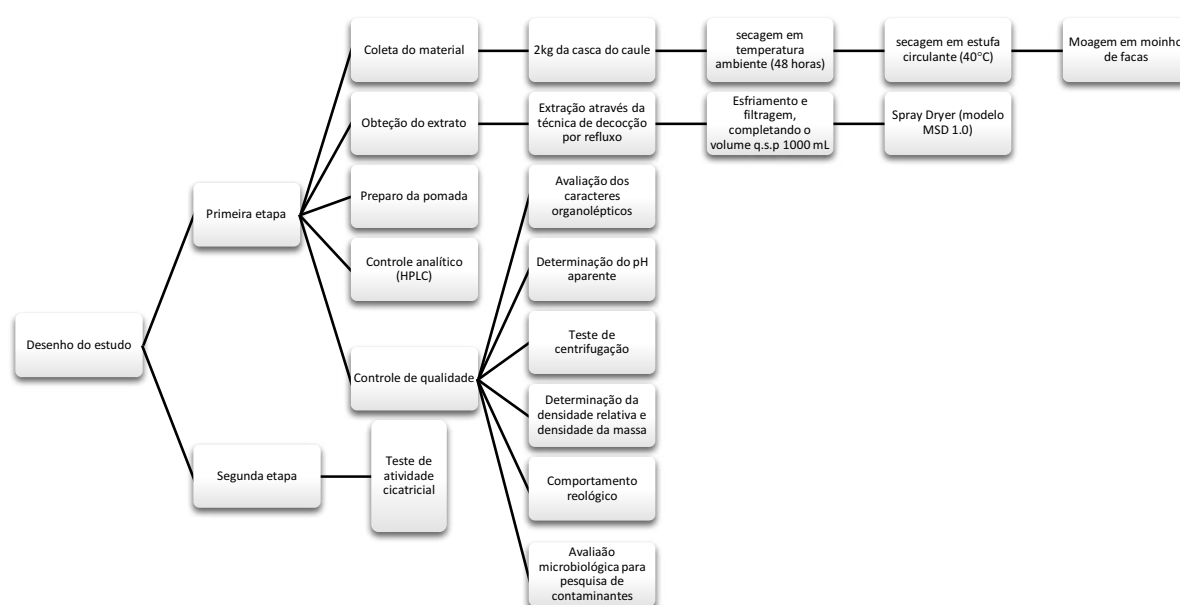


Figura 2 – Representação esquemática do desenho de estudo.

Este estudo foi conduzido pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO/UFAM) em parceria com a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (FCF/UFAM) e com a Universidade Federal do Ceará (UFC). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEA-UFAM – Anexo A), porém devido à indisponibilidade de animais na cidade de Manaus para o referido estudo “*in vivo*” foi necessário a realização do estudo “*in vivo*” Universidade Federal do Ceará (UFC). A submissão no Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará foi aprovado

(Anexo B) e os testes experimentais foram realizados com a ida da equipe da pesquisa para realização do estudo, financiado com recursos próprios.

4.2. Coleta do material Vegetal (*L. ferrea* L.)

Para este estudo foi utilizado como matéria prima a casca do caule da *Libidibia ferrea* L. (Figura 3). As mesmas foram coletadas em uma quantidade suficiente para o desenvolvimento do estudo (aproximadamente 2kg). O processo de coleta foi supervisionado por um etnobotânico e realizado na cidade de Manaus em 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 devido ser uma matéria-prima disponível o ano todo e a fim de eliminar a dependência da sazonalidade da vagem. A casca do caule da espécie *L. ferrea* L. foi colocada para secar a temperatura ambiente por 48 horas, a sombra, em lugar seco e arejado (Figura 4). Em seguida, submetido à secagem em estufa de ar circulante, à temperatura de 40°C, até estabilização da umidade residual (Figura 5). 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 *L. ferrea* L.



Figura 4 – Secagem em temperatura ambiente.



Figura 5 – Estufa de ar circulante.

Figura 6 – Moinho de Facas.

Figura 7 – MPV.

4.3. Obtenção do extrato (*L. ferrea* L.)

Durante o preparo do extrato foram utilizados os princípios de assepsia para que a qualidade do material fosse preservada. 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 (Synth) como líquido extrator, na proporção de 1:1, ambos em uma quantidade de 500mL (Figura 9). 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 (Nova), como mostra a Figura 10.

O material extraído foi retirado, esfriado e filtrado em um balão volumétrico de 1.000 mL e o volume foi completado com água destilada até alcançar 1.000 mL (Figuras 11a e 11b).

A solução extrativa de jucá foi levada para o aparelho Spray Dryer (LabMq - modelo MSD 1.0) para que fosse obtido o extrato seco por aspersão, visando reduzir a pó e manter a sua estabilidade, como mostra nas figuras 12 e 13.



Figura 8 – Pesagem do extrato bruto.



Figura 9 – Água/Etanol.



Figura 10 – Decocctor.



Figura 11a e 11b – Filtragem.



Figura 12 – Aparelho Spray dryer.



Figura 13 – Extrato seco.

4.4. Rendimento do extrato seco

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



Figura 14 – Rendimento do extrato seco a 7,5%.

4.5. Perfil fitoquímico do extrato seco de *Libidibia ferrea* L.

O extrato hidroalcoólico seco de *Libidibia ferrea* L. a 7,5% foi submetido à caracterização das substâncias químicas através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) marca Shimadzu (SPD M 10A) com detector tipo arranjo de diodo, utilizando a metodologia baseada em Silva *et al.* (2019). A técnica metodológica consistiu na pesagem de 0,001g da amostra, adicionando em seguida 20μl H₂O Miliq + 20μl Metanol (Synth). Transferiu-se a mistura para um microtubo (ependorff®), filtrou-se com bolinha de algodão e transferiu-se ao frasco para análise cromatográfica durante 1 hora e 20 minutos. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Os picos dos cromatogramas foram identificados através da comparação dos tempos de retenção e área do padrão do ácido gálico no comprimento de onda de 275nm. Realizou-se a quantificação por integração dos picos através do método padrão externo.

4.6. Preparo da pomada orabase (*L. ferrea* L.)

A concentração da formulação da orabase foi determinada com base no resultado da concentração inibitória mínima (37,5mg/ml) determinado na fase inicial dos estudos do jucá, testados frente à microrganismos da cavidade bucal (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A pomada obedecendo aos princípios da fitoterapia, ao qual enfatiza a matéria-prima vegetal sem isolados, teve como princípio ativo a *Libidibia ferrea* L. a 2% de extrato que anteriormente foi determinada na fase inicial da pesquisa e então recebeu a apresentação como pomada orabase.

A composição da formulação (Figura 15a e 15b) apresenta apenas uma fase oleosa caracterizada conforme descrito na Quadro 1. Todos os compostos foram levados ao equipamento de Banho Maria SL 155/10 para aquecimento até 75° utilizando o termômetro de mercúrio para aferição (Figura 16a e 16b).

Componentes	Proporção
Vaselina Sólida	80%
Óleo mineral	17%
Carboximetilcelulose	0,5%
Propilparabeno	0,15%
Extrato seco <i>Libidibia ferrea</i> L. a 7,5%	2%

Quadro 1 – Componentes da pomada orabase.

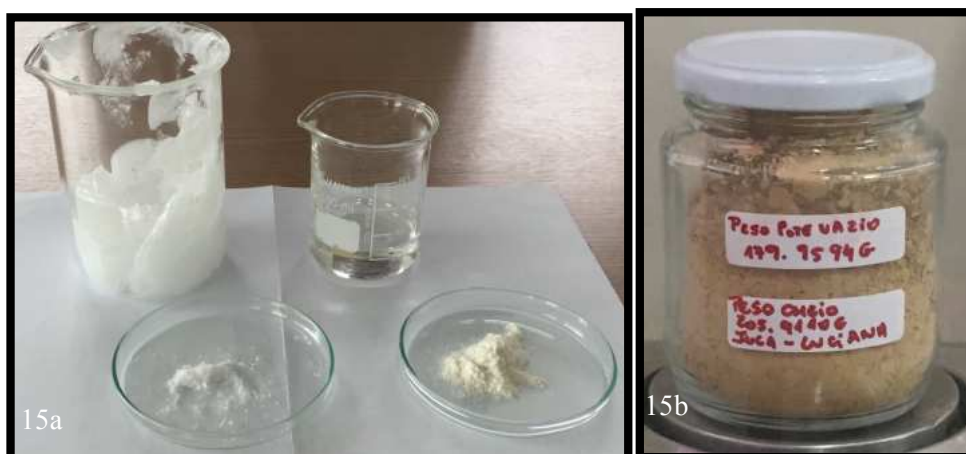


Figura 15a e 15b – Componentes da pomada orabase de *L. ferrea* L. a 2%.



Figura 16a e 16b – Aquecimento em banho maria até atingir 60°.

Após a manipulação da pomada orabase de *L. ferrea* L. a 2% (Figura 17), realizou-se o preparo da orabase sem o jucá (Figura 18) para que fosse realizado o teste no grupo controle do modelo em ratos. Os componentes utilizados foram os mesmos descritos anteriormente.



Figura 17 - Pomada orabase de *L. ferrea* L. a 2%.



Figura 18 - Pomada orabase.

A pomada foi armazenada em locais com diferentes temperaturas e em diferentes períodos. Conforme a padronização descrita na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 1988), os locais escolhidos para o teste foram: temperatura ambiente (claro), temperatura ambiente ao abrigo da luz (escuro) e geladeira; e, os períodos pré-estabelecidos experimentais de

armazenamento: 0, 30 e 60 dias, visto os últimos resultados dos testes de estabilidade realizados (MATOS, 2016), visando a inclusão de uma nova formulação magistral.

4.7. Caracterização da pomada

Baseada nas normatizações padronizadas pela RDC 17/2010 e pelo Formulário de Fitoterápicos (BRASIL, 2010a; BRASIL, 2011) e pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010c) realizou-se as análises físico-químicas referente ao controle de qualidade como comportamento reológico, densidade, centrifugação, pH, avaliação microbiológica e dos caracteres organolépticos seguindo os protocolos pré-estabelecidos descritos posteriormente.

4.7.1. Testes físico-químicos do controle de qualidade

4.7.1.1. Teste de centrifugação

Para a verificação de possível separação de fases durante o teste laboratorial utilizou-se 5g da pomada de orabase de *Libidibia ferrea* L. a 2% a qual foi acondicionada em tubos do tipo falcon® (Figura 19) e, posteriormente, centrifugados (KASVI) a 3000 rpm por 30 minutos (Figura 20), 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 19 - Pomada orabase (5g).



Figura 20 – Centrifugação.

4.7.1.2. Teste de determinação do pH aparente

Aferiu-se o pH (Figura 23) através do potenciômetro (TEC2, TECNAL, Piracicaba, SP, Brasil). A calibração do aparelho foi realizada com soluções-tampão pH 4,0 (Figura 21) e 7,0 (Figura 22) (DINÂMICA, Brasil), estas soluções possibilitam que haja uma linearidade nas respostas em relação às alterações de potencial observadas.

Os testes foram realizados em triplicatas para cada amostra de acordo com os locais de armazenamento, e, os resultados corresponderam à média das leituras de cada amostra.



Figura 21 – Solução de calibração 4,0.



Figura 22 – Solução de calibração 7,0



Figura 23 – Aferição do pH da pomada.

4.7.1.3 Determinação da densidade de massa e densidade relativa

É necessário que o picnômetro esteja limpo, seco e que tenha sido previamente calibrado, a calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio (Figura 24) e da massa com seu conteúdo com água (Figura 25), recentemente destilada e fervida a 20°C. Logo, as amostras foram transferidas para o picnômetro (Figura 26), onde realizou-se o ajuste da temperatura 20°C e quando necessário remover o excesso do produto e pesar. O peso das

amostras foi determinado através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. Calculando a densidade relativa através da fórmula: $p_{(amostra)} = d_{(água)} \times d_{(amostra)} + 0,0012$.



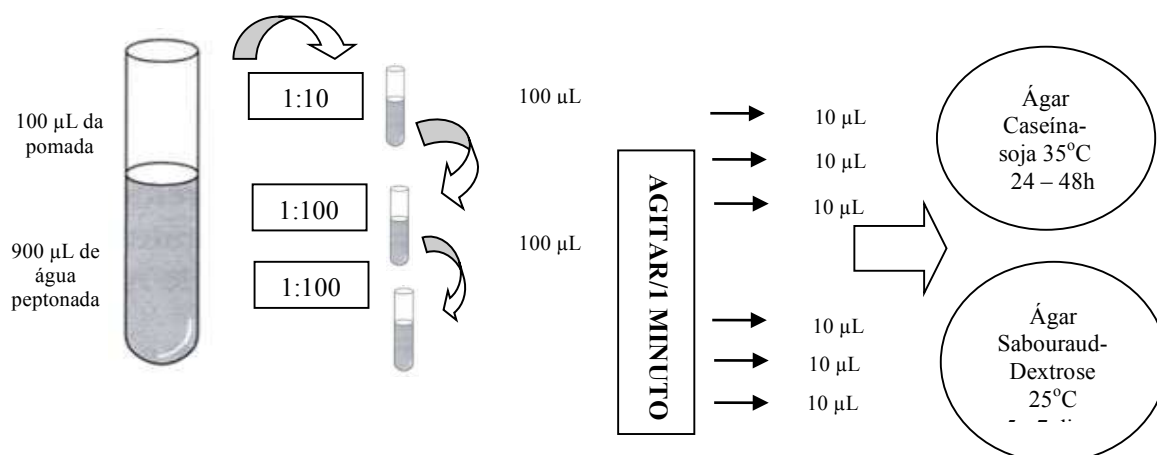
Figura 24 – Picnômetro vazio. Figura 25 – Picnômetro com água. Figura 26 – Picnômetro cheio.

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

O controle microbiológico da pomada orabase foi constituído pela determinação do número total de microrganismos aeróbios e pesquisa de levedura, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, conforme preconizado na Farmacopeia Brasileira (2010), em triplicata.

A pomada foi preparada na proporção 1:10, onde foram utilizados uma proporção da pomada (100 µL) para 900 µL de água peptonada, pH 7,2, em seguida diluídas e homogenizadas nas proporções 1:10; 1:100; 1:1000.

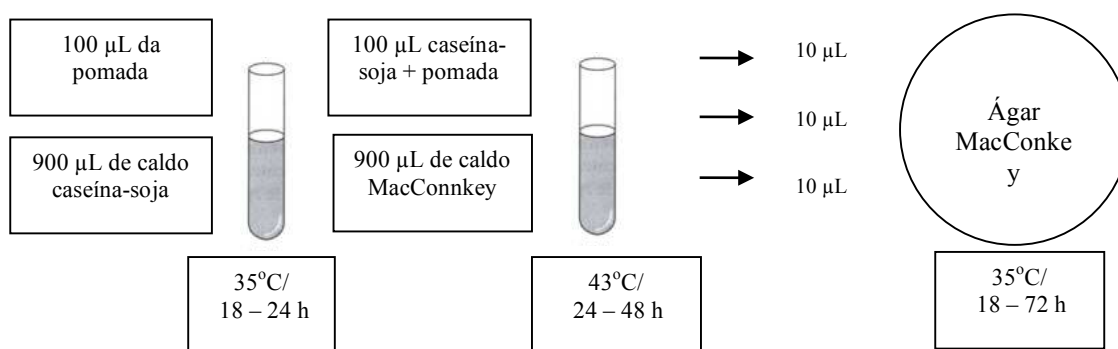
Para a contagem em placa dos microrganismos, adicionou-se 10 µL de cada amostra e diluição, em triplicata, contendo em cada placa de petri, separadamente, ágar Caseína-soja e ágar Sabouraud-dextrose. As placas foram incubadas, ágar Caseína-soja a 35°C durante 24 e 48 horas para determinação de microrganismos aeróbicos totais, ágar Sabouraud-dextrose a 25 °C durante 5 a 7 dias para determinação de fungos filamentosos e leveduras. Decorrido este período, na presença de colônias, calculou-se o número de UFC/mL, esquema 1.



Esquema 1: Esquema para pesquisa do número total de microrganismos

Fonte: Venâncio *et al.*, 2015.

Para pesquisa de *Escherichia Coli*, foi utilizado uma proporção da pomada para 900 µL de caldo caseína-soja, o qual foi homogeneizado e incubado a 35 °C durante 18 - 24 horas. Após esse período, 100 µL do caldo caseína-soja será transferido para tubos contendo 900 µL de caldo MacConkey, o qual foi incubado a 43 °C $\pm$ 1 °C durante 24 - 48 horas. A subcultura foi semeada em placa de ágar MacConkey e incubada a 35 °C durante 18-72 horas. O crescimento e características das colônias foram observados. Caso houvessem colônias suspeitas, as mesmas seriam semeadas em ágar eosina azul de metileno (EMB) e incubados a 35 °C por 24 horas, esquema 2.

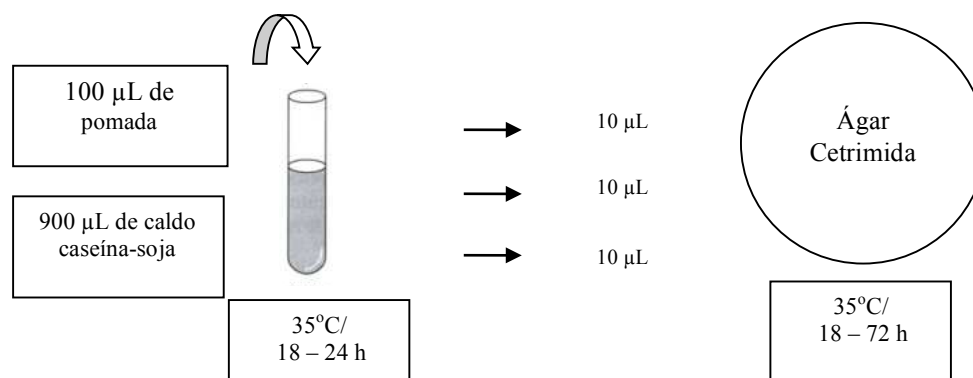


Esquema 2: Esquema para pesquisa de *Escherichia coli*

Fonte: Venâncio *et al.*, 2015.

Para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizou-se uma proporção da pomada para 900 µL de caldo caseína-soja, a qual foi homogeneizada e incubada a 35 °C durante 18 - 24

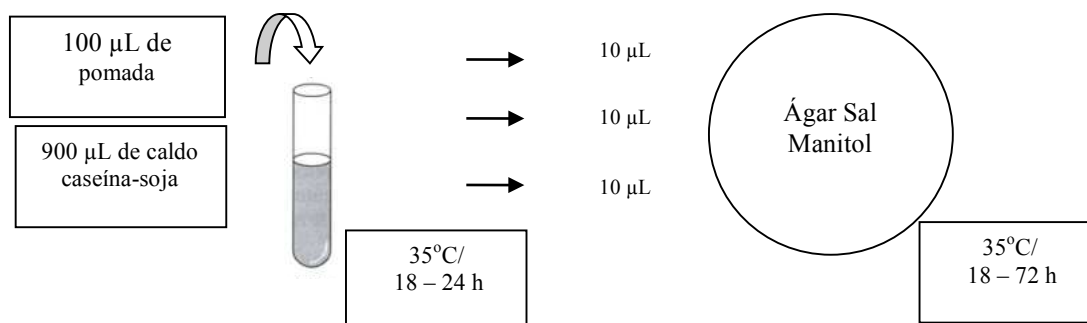
horas. Após esse período, semeou-se em ágar Cetrímida, incubado a 35 °C durante 18-72 horas, esquema 3.



Esquema 3: Esquema para pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa*

Fonte: Venâncio *et al.*, 2015.

Para pesquisa do *Staphylococcus aureus*, utilizou-se uma proporção da pomada para 900 µL de caldo de caseína-soja, homogeneizado e incubado a 35°C durante 18 a 24 horas. Após esse período, semeado em ágar sal manitol e incubado a 35°C durante 18-72 horas, esquema 4.



Esquema 4: Esquema para pesquisa de *Staphylococcus aureus*

Fonte: Venâncio *et al.*, 2015.

4.7.2. Comportamento reológico

As características reológicas foram avaliadas com o auxílio do viscosímetro rotacional digital de Brookfield Marte® MVD-5 (Figura 27), utilizando o spindle 2 (Figura 28), as análises foram baseadas no protocolo da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010c) e Marafon (2016). Após o ajuste de cada fator de velocidade (rotação 6, 12, 30 e 60), efetuou-se a leitura dos valores de viscosidade e tensão de cisalhamento, a uma temperatura de 25°C ±2°C, e os reogramas foram representados por gráficos.



Figura 27 – Viscosímetro de Brookfield.



Figura 28 - Spindle 2.

4.7.3. Avaliação dos caracteres organolépticos

Com relação à cor e o brilho a análise realizou-se a análise, baseando-se sobre a luz do dia ou sob lâmpadas de comprimento de onda similares aos da luz do dia e a cor da amostra comparada com o material de referência em escala de cor padrão. Através do toque e sensibilidade a consistência avaliou-se observando suas características.

Quanto ao odor a verificação verificou-se através de uma pequena amostra da orabase colocada diretamente na palma da mão previamente higienizada ou em um recipiente de vidro e será feita a inalação, lentamente, até que o odor seja definido; sendo que esse procedimento foi repetido. Sendo assim, foram verificadas, a intensidade do odor: nenhum; fraco; distinto ou forte e, a seguir, a sensação causada pelo odor: aromático; frutoso; mofado ou rançoso.

4.8. Teste da atividade cicatricial em mucosa jugal de ratos

A metodologia utilizada neste estudo tem como referência o trabalho de Alves *et al.* (2011), o qual propôs um modelo experimental para indução de úlceras em mucosa de ratos. Este modelo está sendo reproduzido associando a ele o teste terapêutico da nova formulação.

O estudo foi realizado utilizando um total de 84 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia Mammalia*), linhagem Wistar, machos adultos da linhagem, pesando entre 200 e 300g. Os animais foram mantidos em gaiolas de plástico, em uma temperatura a 24°C num

ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração labina (a base de caseína Rat Chow). As caixas dos animais, tampas e bebedouros foram higienizadas com detergente líquido e hipoclorito de sódio a 10% (Figura 30).

Inicialmente, realizou-se o teste experimental em três grupos. Os animais foram distribuídos e identificados em 04 caixas (Figura 29) e todos foram pesados antes da indução da úlcera (Figura 31). O primeiro grupo (Grupo I Teste – tratamento com a pomada orabase de *Libidibia ferrea* L. a 2%) continha 07 ratos (R); o segundo grupo (Grupo II controle orabase – tratamento somente com a orabase) continha 07 ratos; e o terceiro grupo (Grupo III - controle positivo) – tratamento à base de Acetonida de triancinolona “Oncilon” era constituído de 08 ratos, com os pesos retratados no Apêndice 1.



Figura 29 – Grupos de estudo acondicionados em suas respectivas caixas.



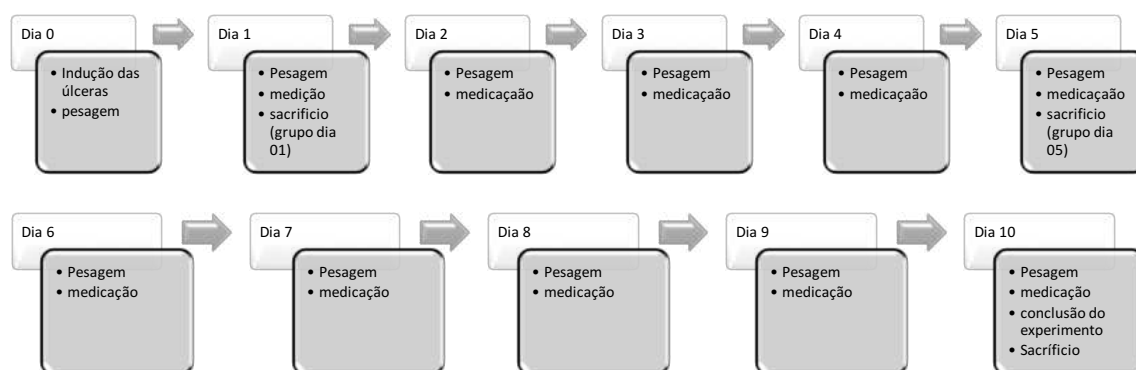
Figura 30 – Caixa de acondicionamento.



Figura 31 – Pesagem dos animais.

O estudo realizou-se avaliando os seguintes parâmetros: diâmetro ulcerativo, o peso corpóreo dos animais, bem como o score histopatológico através da análise histológica. O

diâmetro ulcerativo foi analisado nos dias 01, 05 e 10 dias, bem como o peso corpóreo e a análise histopatológica, conforme descrito nos tópicos subsequentes. A linha do tempo do estudo pode ser observada no esquema 5.



Esquema 5 – Linha do tempo do estudo “*in vivo*” experimental.

4.8.1. Indução da Ulceração

Realizou-se o relaxamento e a sedação dos animais com Cloridrato de Ketamina 5 mg/kg– *Dopalen AgribRANDS Ltda.* (proporção de 80%) associado ao Cloridrato de Xilazina 80mg/kg – *Anasedan AgribRANDS Ltda.* (20%), demonstrados nas Figura 32 e 33, e quando o reflexo da pálpebra e o ritmo de respiração constante foram cessados, cada animal foi colocado em uma mesa (Figura 34) e iniciou-se o processo cirúrgico. Realizou-se a antisepsia da mucosa jugal com swab embebido em Digluconato de Clorexidina a 0,12%. Em seguida, uma ulceração traumática foi induzida sobre a mucosa jugal por abrasão usando uma lâmina de bisturi nº15 (Figura 35), próximo a linha de oclusão do lado esquerdo (Figura 36), padronizadas em 8mm de diâmetro (adaptado de Alves *et al.*, 2011). A técnica operacional foi realizada pelo mesmo operador para todos os animais. Após a etapa cirúrgica, os animais foram observados no período pós-operatório até a recuperação total dos reflexos.



Figura 32 – Relaxante muscular e anestésico.



Figura 33 – Anestesia dos animais.



Figura 34 – Caixa de acondicionamento (instrumentais).



Figura 35 – Indução ulcerativa.



Figura 36 – Úlcera induzida em mucosa jugal – lado esquerdo.

Os animais foram observados e pesados diariamente durante 10 dias, período esperado para que houvesse remissão espontânea da lesão para o grupo de controle negativo. Os animais foram sacrificados após um período de estudo de 10 dias, e uma secção da

mucosa jugal contendo a úlcera induzida foi devidamente coletada para a análise histopatológica em diferentes tempos experimentais.

4.8.2. Avaliação clínica

Nos dias de sacrifício, as úlceras foram mensuradas com o uso de um paquímetro digital de precisão de 0,005mm, como demonstrado na Figura 37 (L=maior diâmetro; m=menor diâmetro) para calcular a área ($\text{Área} = \pi \times \text{maior diâmetro} \times \text{menor diâmetro}$). Todas as mensurações foram realizadas pelo mesmo operador.



Figura 37 – Mensuração com paquímetro digital.

4.8.3. Avaliação da diferença de peso corpóreo

Primeiramente, os animais foram pesados no momento anterior à indução das úlceras (peso inicial), 24h após o momento de indução, e também nos dias subsequentes até o momento da eutanásia (peso final), como podemos observar no apêndice 1, para a avaliação de massa corpórea de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Variação de Massa corpórea (\%)} = (\text{Massa final} - \text{Massa inicial}) / (\text{Massa inicial}) \times 100.$$

4.8.4. Aplicação dos fármacos

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

Para a 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 *swab* estéril.

Aplicou-se a pomada orabase de jucá no grupo teste Grupo I (Figura 38), somente a orabase como controle no Grupo II (Figura 39), e a pomada Acetonida de triancinolona no grupo controle positivo Grupo III (Figura 40), contendo quantidade suficiente para cobrir a ulceração. A droga foi aplicada duas vezes ao dia, durante os 10 dias após a indução da úlcera.



Figura 38, 39 e 40 – Aplicação dos agentes testes: pomada orabase de jucá, somente a orabase e pomada Acetonida de triancinolona, respectivamente.

4.8.5. Análise Histológica

Após a realização da fase experimental, fragmentos da mucosa jugal foram recolhidos (Figura 41) e fixados em formol a 10% (Figura 42), durante 48 horas, para montagem das lâminas.

Os espécimes foram analisados, macroscopicamente, submetidos à desidratação em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol, impregnados em parafina e fundidos a 60% (Figura 43). Em seguida, os fragmentos foram colocados em blocos de parafina e solidificados à temperatura ambiente (Figura 44); os fragmentos foram seccionados em 5 micrômetros de espessura através da utilização de um micrótomo (Figura 45a e 45b) e com coloração

histológica de rotina pela hematoxilina-eosina foi realizada (Figura 46), observando o esquema do preparo das lâminas na figura 47.



Figura 41 – Remoção do fragmento.



Figura 42 – Fixação em Formol a 10%.



Figura 43 – Bloco de parafina.



Figura 44 – Solidificação do bloco.



Figura 45a – Microtômo.



Figura 45b – Incorporação do corte em lâmina.



Figura 46 – Coloração Hematoxilina-eosina das lâminas histológicas.

Quanto à leitura das lâminas, foi realizada em microscópio óptico, e as características histológicas da úlcera 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. O grau de concordância intra-examinador foi verificado através do índice *Kappa*. A leitura das lâminas do estudo somente foi iniciada após o teste *Kappa* apresentar coeficiente igual ou acima de 0,8. 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. Estas fotos foram codificadas e reapresentadas ao examinador após 7 dias e em ordem aleatória. Após a segunda leitura, foi determinado o coeficiente *Kappa* intra-examinador. Os parâmetros histopatológicos foram determinados e pontuados de 0 a 4 de acordo com as informações abaixo – anexo C (Tabela 1 – Parâmetros histológicos: Alves *et al.*, 2011 – adaptado de CHO *et al.*, 2006).

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

Tabela 1 – Parâmetros histológicos. Fonte: ALVES et al., 2011.

4.8.6. Condições de alojamento e alimentação dos animais

Os ratos estavam sendo mantidos em doze gaiolas de plástico, cada uma contendo 07 animais, com maravalha autoclavada sob ciclo claro-escuro de 12 horas com livre acesso à ração labina (a base de caseína *Rat Chow*) e água a vontade (*ad libitum*), sob condições adequadas de luz e temperatura. As salas onde os animais foram alojados eram equipadas com sistema de ventilação: trocas de ar adequadamente dimensionado (Figura 47).



Figura 47 – Área de acondicionamento das gaiolas.

4.8.7. 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 de 7 animais de cada grupo, totalizando 84 animais ao término do experimento. Houve a morte de dois animais do grupo controle orabase no presente estudo após a sedação e relaxamento muscular, não interferindo no número amostral total.

4.9 Análise estatística

Os dados foram apresentados por meio de gráficos e tabelas. Na análise dos dados quantitativos, como foi rejeitada a hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, foi calculada a mediana e os quartis (Q_i) para confecção do gráfico de box plot e aplicado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* para comparação das medianas. (VIEIRA, 2004).

Na análise dos dados quantitativos, como foi rejeitada a hipótese de normalidade por meio do teste de *Shapiro-Wilk*, foi calculada a mediana e os quartis (Q_i) para confecção do gráfico de box plot e aplicado o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* para comparação das medianas. O software utilizado na análise da maioria dos dados foi o programa Minitab versão 18 e o nível de significância fixado na aplicação dos testes estatísticos foi de 5% (VIEIRA, 2004).

5. RESULTADOS

5.1. Perfil fitoquímico do extrato de *L. ferrea* L.

As condições utilizadas foram a coluna de fase reversa KP-C18-HS (Biotage, VA, USA), com o sistema de eluição previamente ativada com metanol e condicionada com água. As análises, realizadas em triplicata foram realizadas empregando um fluxo de $0,3\text{mL}/\text{min}^{-1}$ e detecção a 250nm. O perfil fitoquímico comprovaram a presença de inúmeros compostos (taninos, flavonoide, polifenóis), porém três são majoritários: ácido gálico, ácido elágico e rutina conforme cromatograma apresentado na figura 49.

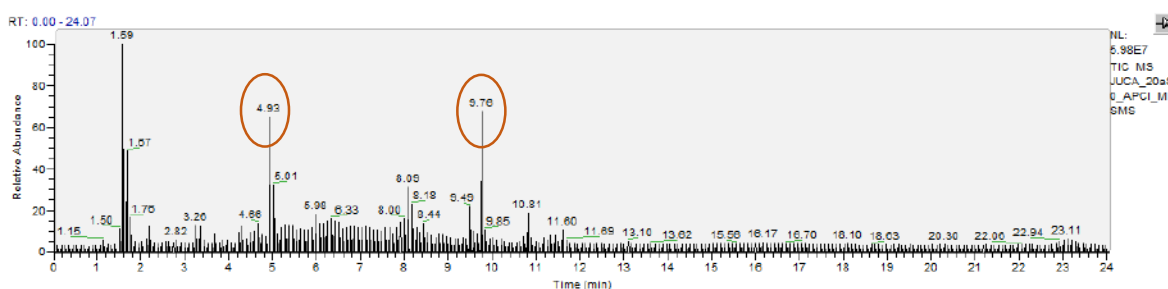


Figura 48 – Perfil Fitoquímico do extrato seco da casca do caule de *L.ferrea* L.

5.2. Teste de centrifugação

No teste de centrifugação, realizado em triplicatas, observou-se a separação de 1 fase oleosa da pomada de *L. ferrea* L.a 2% em todos os tempos (0, 30 e 60 dias) e ambientes. No tempo de 60 dias na condição de armazenamento da temperatura ambiente escuro, houve a presença de precipitado. Os resultados são apresentados na figura 49, 50 (a, b e c) e 51 (a, b e c).



Figura 49 – Teste de centrifugação da pomada com separação de fases (tempo 0).

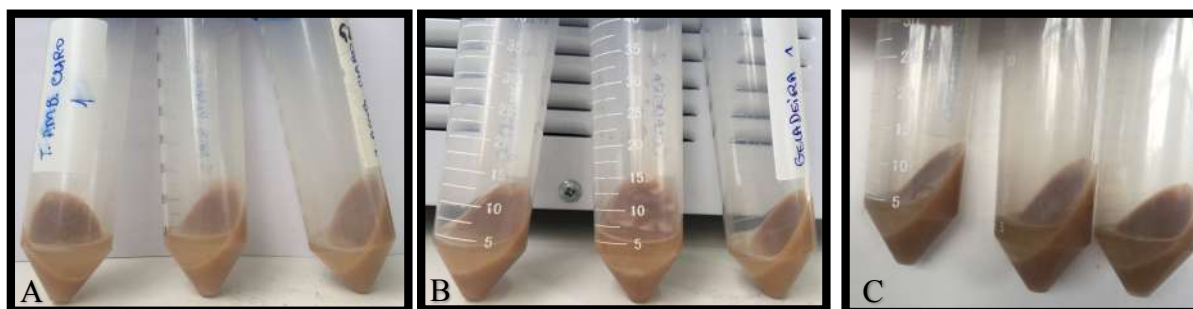


Figura 50a, 50b e 50c – Aspecto visual das amostras após teste de centrifugação demonstrando separação de fase (tempo 30).

Legenda: A – Temperatura Ambiente Claro; B – Geladeira; C – Temperatura Ambiente Escuro

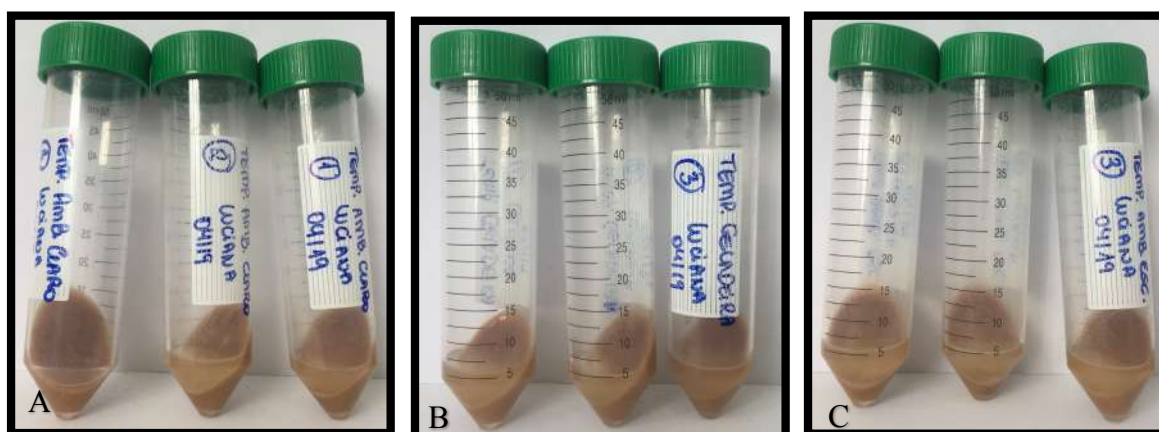


Figura 51a, 51b e 51c – Aspecto visual das amostras após teste de centrifugação demonstrando separação de fase (tempo 60).

Legenda: A – Temperatura Ambiente Claro; B – Geladeira; C – Temperatura Ambiente Escuro

5.3. Teste de determinação do pH aparente

A determinação do pH da pomada de *L. ferrea* L. a 2% foi obtido nos tempos experimentais 0, 30 e 60 dias de armazenamento em diferentes locais (Temperatura ambiente claro - TAC, Temperatura ambiente escuro - TAE e Geladeira - G). Os resultados são apresentados na tabela 2 e gráfico 1. Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística ao comparar os valores de pH entre os tempos e condições de armazenamento testados (T30 $p=0,061$ e T60 $P=0,079$).

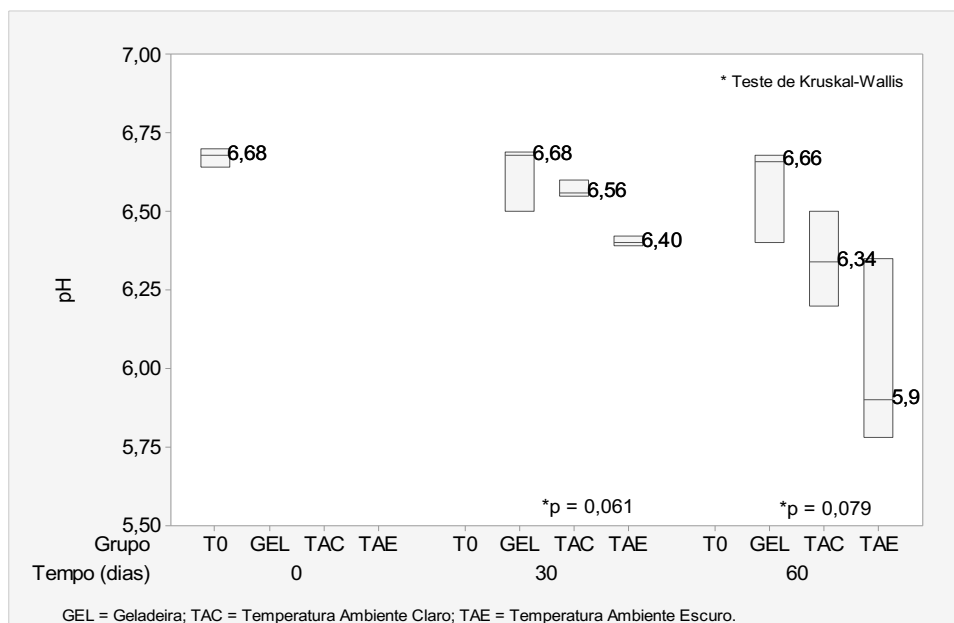


Gráfico 1 - Comparação da mediana do pH em relação aos grupos em 30 e 60 dias, Manaus - AM.

	T0	T30			T60		
	T0	Geladeira (2 a 8°C)	Temp. ambiente claro (25,9°C)	Temperatura ambiente escuro (28,8°C)	Geladeira (2 a 8°C)	Temperatura ambiente claro (25,9°C)	Temperatura ambiente escuro (28,8°C)
1ª	6,64	6,68	6,55	6,40	6,66	6,50	5,90
Leitura							
2ª	6,68	6,69	6,56	6,42	6,68	6,34	5,78
Leitura							
3ª	6,70	6,50	6,60	6,39	6,40	6,20	6,35
Leitura							
Média	6,68	6,68	6,56	6,40	6,66	6,34	5,90

Tabela 2 – Valores de pH após a formulação da pomada (T0), após 30 (T30) e 60 dias (T60) nos diferentes ambientes.

5.4. Determinação da densidade da massa e densidade relativa

A densidade da pomada de *L. ferrea* L. a 2% foi obtida no tempo 0, 30 e 60 dias de armazenamento, em diferentes locais citados anteriormente. No tempo 0 obteve-se a média de 0,958g/cm³. Após 30 dias de formulação, as médias das densidades foram: geladeira (0,971g/cm³), temperatura ambiente claro (0,976g/cm³) e temperatura ambiente escuro (0,975g/cm³). Nos 60 dias de formulação, as médias das densidades foram: geladeira (0,935g/cm³), temperatura ambiente claro (0,974g/cm³) e temperatura ambiente escuro

(0,968g/cm³). Os valores demonstram a estabilidade da formulação durante os 60 dias de controle de qualidade, sem diferenças entre os grupos nas condições de armazenamento testadas.

5.5. Avaliação microbiológica para pesquisa de contaminantes – Controle microbiológico da pomada de *Libidibia ferrea* L.

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, conforme demonstrado nas figuras 52 a 70.

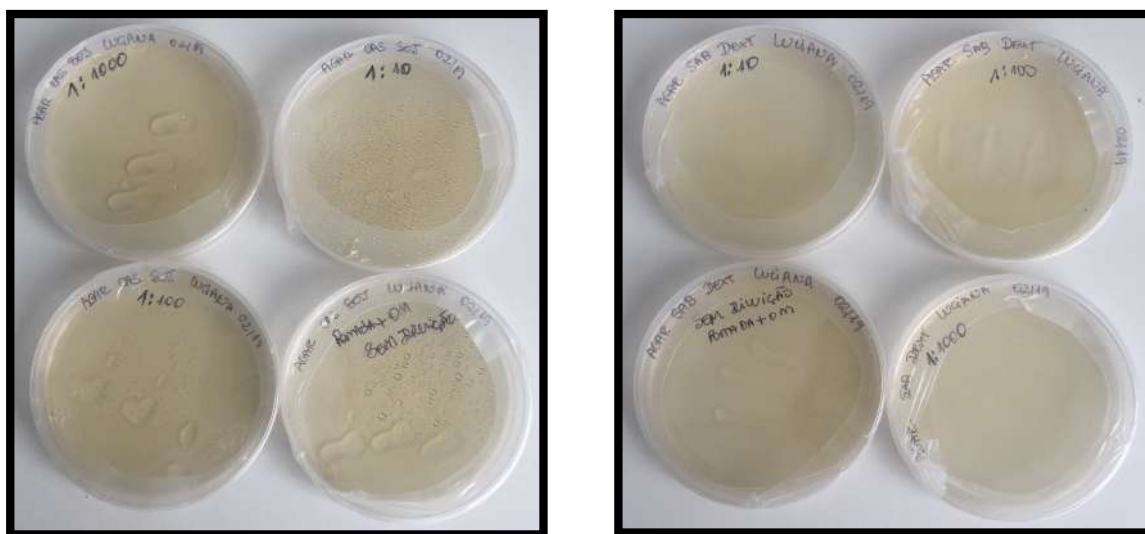


Figura 52 e 53 – Controle microbiológico tempo 0 – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose.

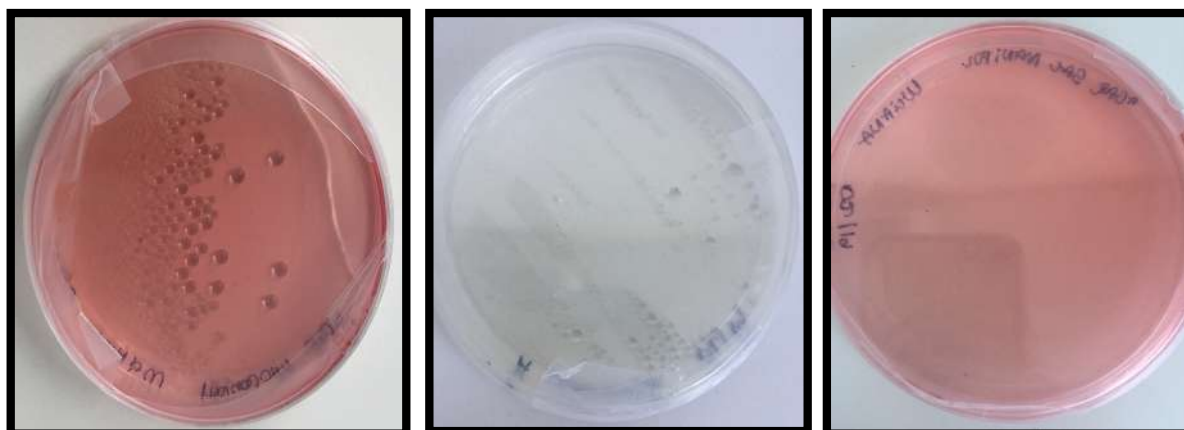


Figura 54, 55 e 56 – Controle microbiológico tempo 0 – ágar MacConkey, ágar cetrimida e ágar sal manitol.

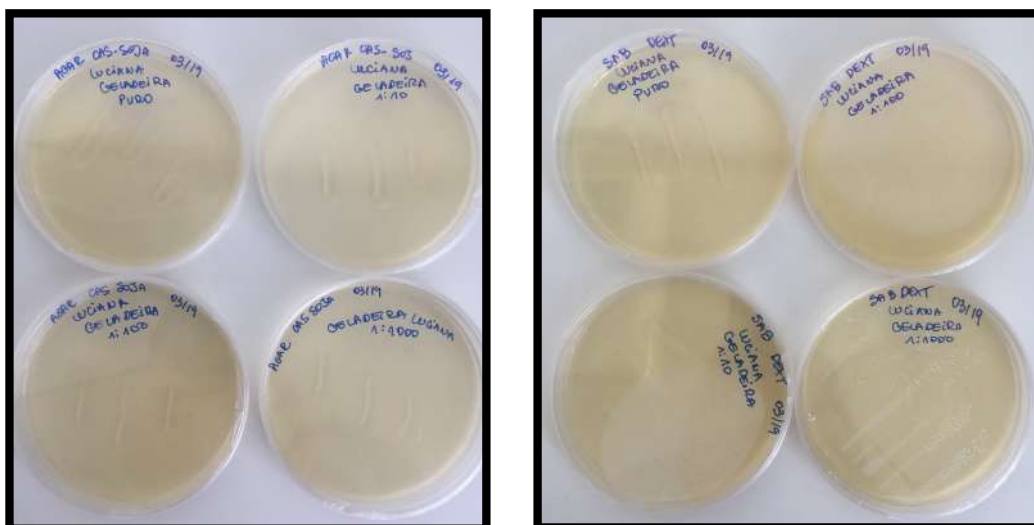


Figura 57 e 58– Controle microbiológico tempo 30 (Geladeira) – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose.

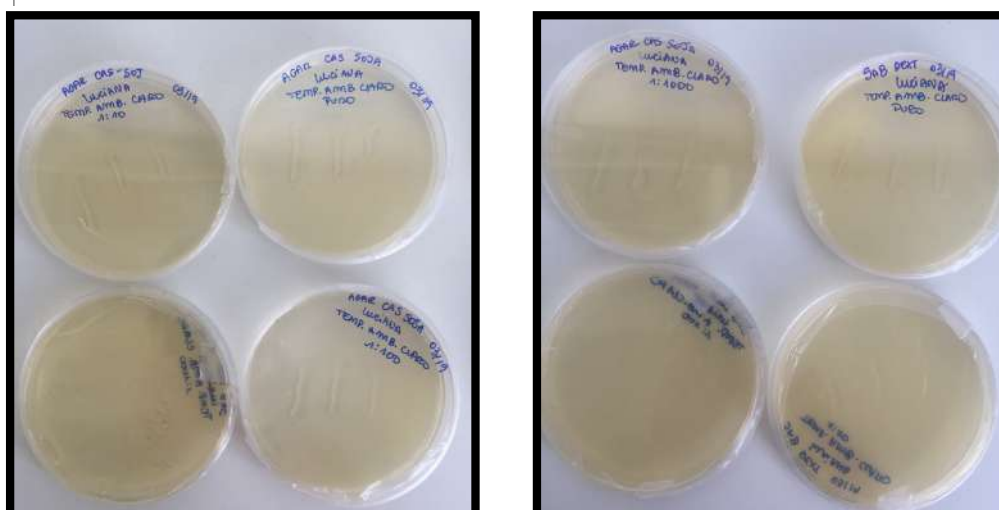


Figura 59 e 60 – Controle microbiológico tempo 30 (TAC) – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose.

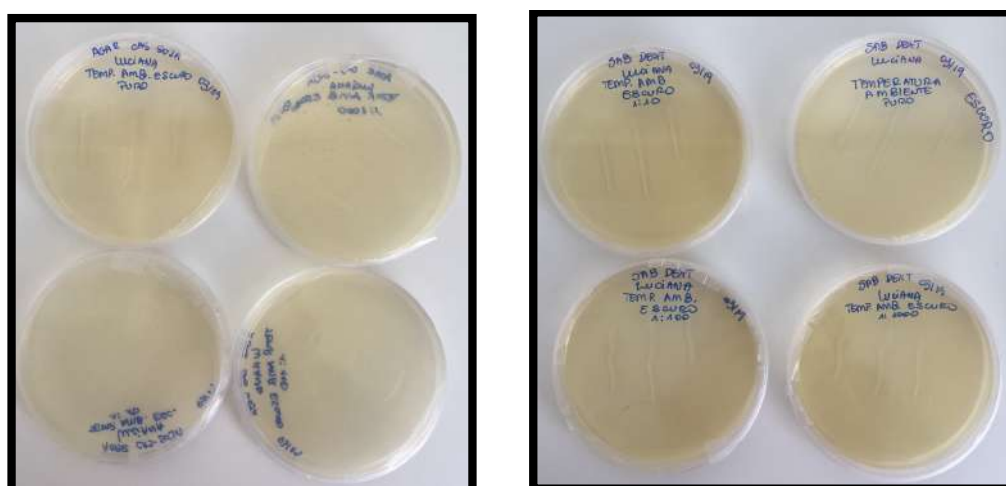


Figura 61 e 62 – Controle microbiológico tempo 30 (TAE) – ágar caseína-soja e ágar saboraud-dextrose.



Figura 63 – Controle microbiológico tempo 30 (TAC, TAE e Geladeira) – ágar MacConkey.



Figura 64 - Controle microbiológico tempo 30 (TAC, TAE e Geladeira) – ágar Cetrimida.

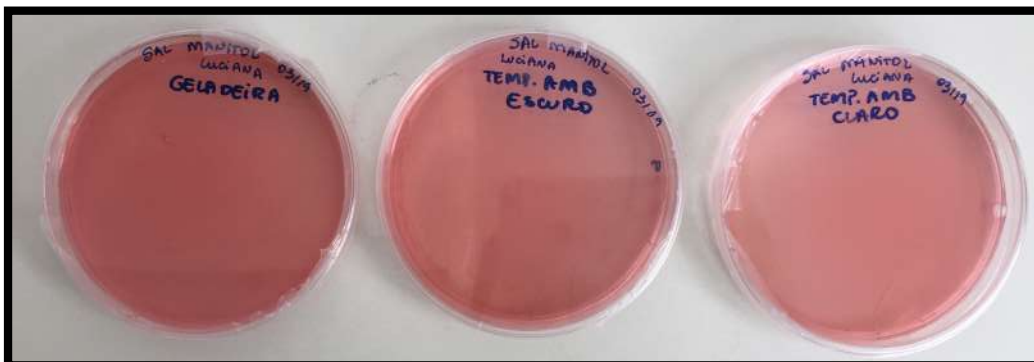


Figura 65 – Controle microbiológico tempo 30 (Geladeira, TAE e TAC) – ágar Sal Manitol.

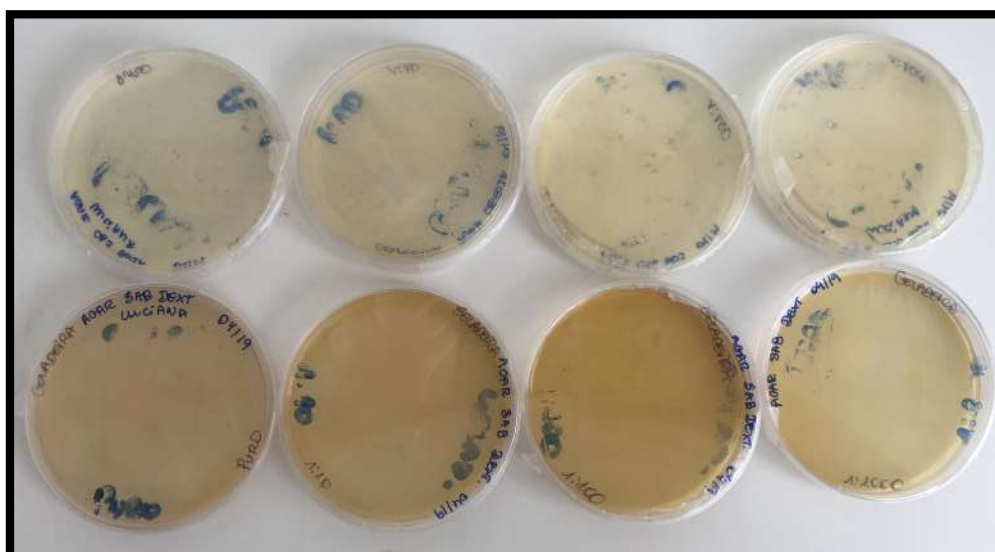


Figura 66 – Controle microbiológico tempo 60 (Geladeira) – ágar caseína-soja e ágar Sabouraud-dextrose.

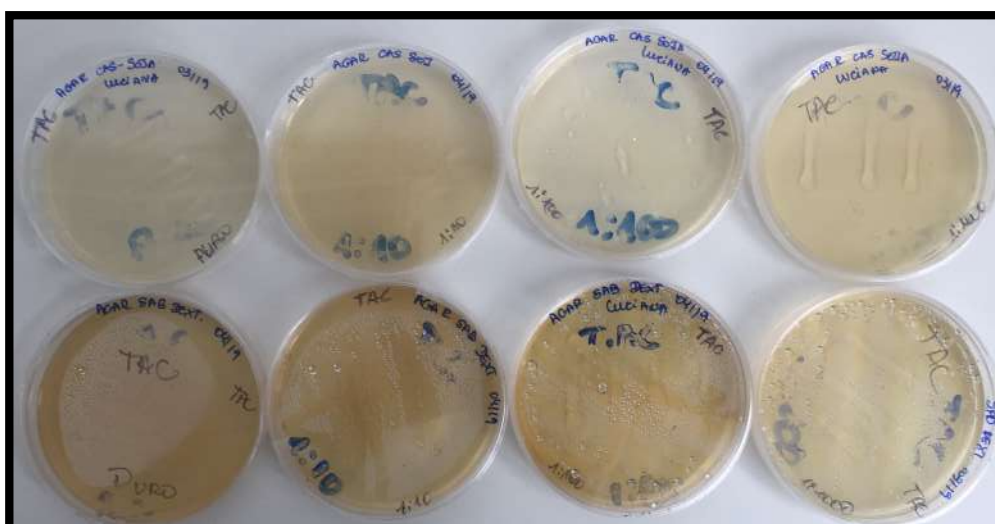


Figura 67 – Controle microbiológico tempo 60 (TAC) – ágar caseína-soja e ágar Sabouraud-dextrose.

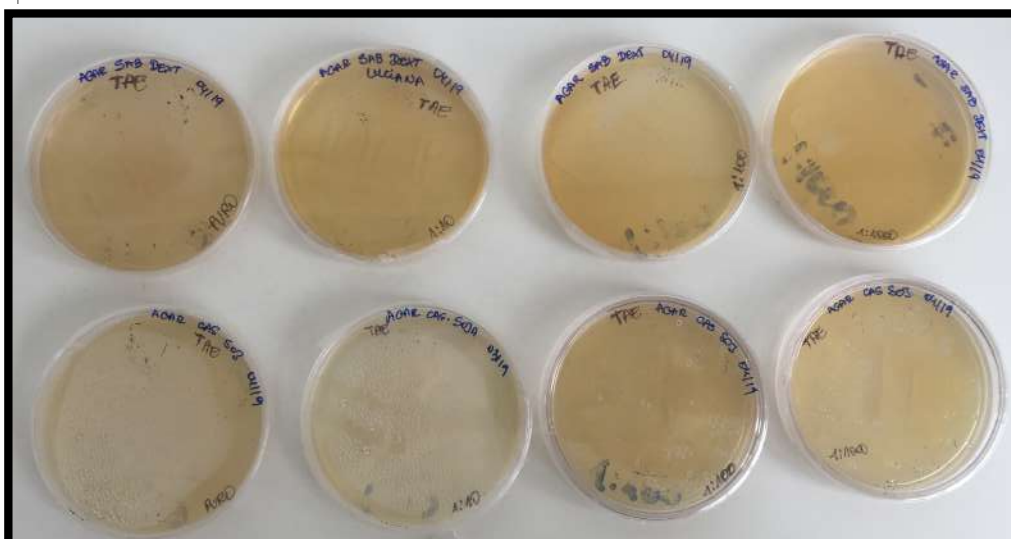


Figura 68 – Controle microbiológico tempo 60 (TAE) – ágar caseína-soja e ágar Sabouraud-dextrose.



Figura 69 – Controle microbiológico tempo 60 (TAE, Geladeira e TAC) – ágar MacConkey.

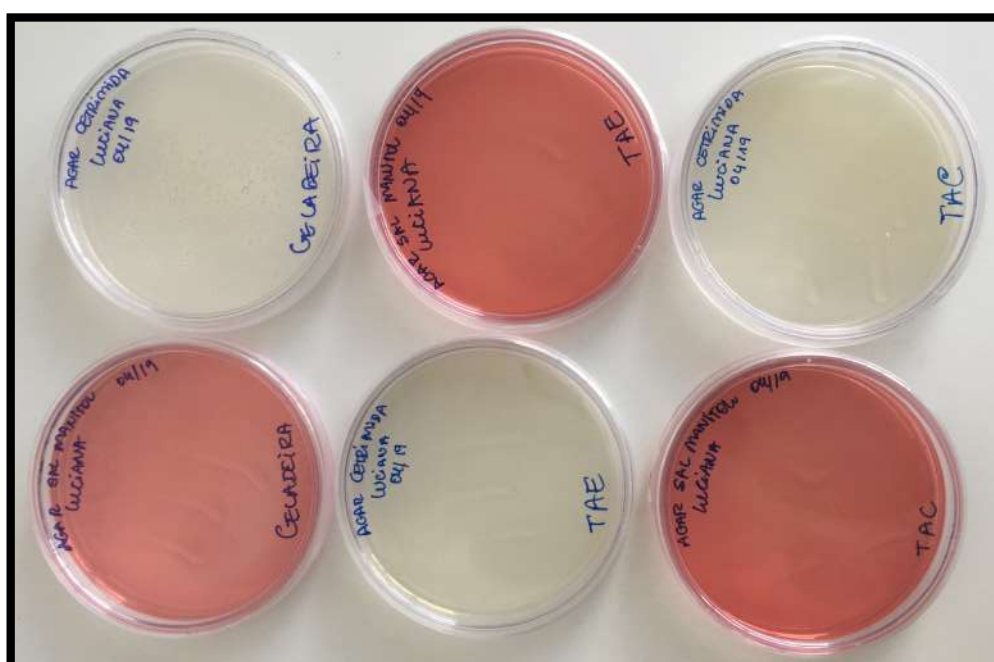


Figura 70 – Controle microbiológico tempo 60 (Geladeira, TAE e TAC) – ágar Cetrimida e Sal Manitol.

5.6. Comportamento reológico

Os resultados descritos na tabela 3 demonstram que a viscosidade da pomada orabase 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. a 2% é não newtonianas e com provável comportamento pseudoplástico, ou seja, a viscosidade diminui com o aumento da tensão, tornando-se mais fluido.

Tempo/ Rotação	Grupos								
	T0		Geladeira		TAC		TAE		p*
	Med	d _i	Med	d _i	Med	d _i	Med	d _i	
T0									
6	5107,2	1,9	-	-	-	-	-	-	
12	2553,1	2,0	-	-	-	-	-	-	
30	1022,5	5,3	-	-	-	-	-	-	
60	512,4	3,0	-	-	-	-	-	-	
T30									
6	-	-	5117,4	2,3	5112,0	11,6	5107,2	11,0	0,393
12	-	-	2554,3	17,9	2552,5	6,4	2553,0	0,6	0,550
30	-	-	1020,5	1,3	1023,9	5,8	1022,0	0,3	0,026
60	-	-	512,6	2,9	512,5	4,1	511,2	1,0	0,561
T60									
6	-	-	5113,8	16,0	5111,6	7,8	5107,5	91,9	0,301
12	-	-	2557,1	16,5	2556,9	1,8	2554,4	0,6	0,292
30	-	-	1028,6	8,7	1026,0	3,2	1022,2	0,2	0,288
60	-	-	512,9	1,5	512,0	3,4	511,0	0,1	0,059

Med = mediana; d_i = desvio interquartil; * Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 3 - Comparação da mediana da viscosidade em relação aos grupos em 30 e 60 dias conforme as rotações, Manaus - AM.

5.7. Avaliação dos caracteres organolépticos

Durante a avaliação das características organolépticos, analisou-se 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® (Figura 71). A pomada caracterizou-se por possuir odor forte e aromático, com presença de brilho e consistência lisa, ausente de granulações (Figura 72).



Figura 71 – Determinação da cor através da escala de cor Coral®.



Figura 72 – Aspecto visual da pomada orabase de *L. ferrea* L. de consistência lisa e brilhante, ausente de granulações.

5.8. Teste de atividade cicatricial em mucosa jugal de ratos

A atividade cicatricial foi avaliada segundo três critérios: diâmetro ulcerativo, variação de peso corpóreo e escore histopatológico.

5.8.1 Diâmetro ulcerativo

O quadro 2 e o gráfico 2 revelam os diâmetros das úlceras de acordo com os grupos experimentais. Na comparação intragrupo, todos os animais reduziram as áreas ulcerativas do primeiro ao décimo dia, contudo em relação ao grupo Omcilon, não foram encontradas diferenças entre os diâmetros das feridas entre o primeiro e quinto dia, bem como entre o quinto e o décimo dia. Em relação ao grupo Orabase e Jucá houve redução significativa do primeiro

ao décimo dia ($p=0,004$). As áreas ulcerativas correspondentes aos grupos e dias podem ser observadas na figura 73.

Grupo	Diâmetro da ulcera		
	1 dia	5 dia	10 dia
Orabase	77,35±15,41	41,95±6,99	9,98±3,68
Jucá	79,75±6,76	25,97±6,79	3,15±3,02
Omcilom	80,82±6,76	52,81±6,72	30,25±6,52

Quadro 2 - Diâmetro médio das úlceras orais nos dias 01, 05 e 10. (Média± EPM/ Teste de Kruskal-wallis/ Pós teste de Dunn)



Figura 73 - Representação clínica das úlceras orais tratadas com Orabase, Extrato de Jucá e Omcilon nos dias 01, 05 e 10.

Já na comparação intergrupos, no primeiro dia de análise, não foram encontradas diferenças significativas entre os 3 grupos analisados, onde todos os grupos apresentaram diâmetro médio de úlceras de maneira similar ($p=0,994$). Entretanto, na análise do dia 5, os diâmetros das úlceras do grupo Jucá foram significativamente menores em comparação aos grupos Orabase e Omcilon ($p=0,005$), enquanto esses últimos não diferiram entre si. No dia 10, o grupo Omcilon demonstrou áreas de úlcera maiores que os grupos Jucá e Orabase, com diferença estatística significativa ($p=0,004$).

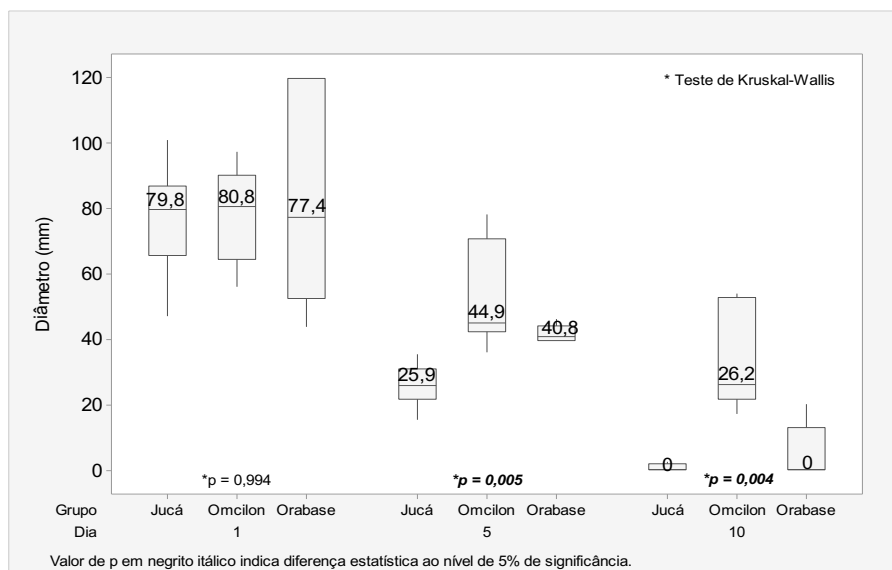


Gráfico 2 - Comparação dos diâmetros da lesão em relação aos grupos nos diferentes dias, Manaus - AM.

5.8.2 Variação de peso corpóreo

Em relação ao peso dos animais, todos os grupos aumentaram ou mantiveram o peso ao final do período de dez dias de experimento, não demonstrando diferença estatística significativa ($p=0,240$). Entretanto, o ganho de peso foi menor no grupo Omcilon, o qual apresentou menor peso corpóreo entre os dias 1 e 5 em relação aos grupos Orabase e Jucá, sem significância estatística ($p=0,484$), conforme representado no gráfico 3.

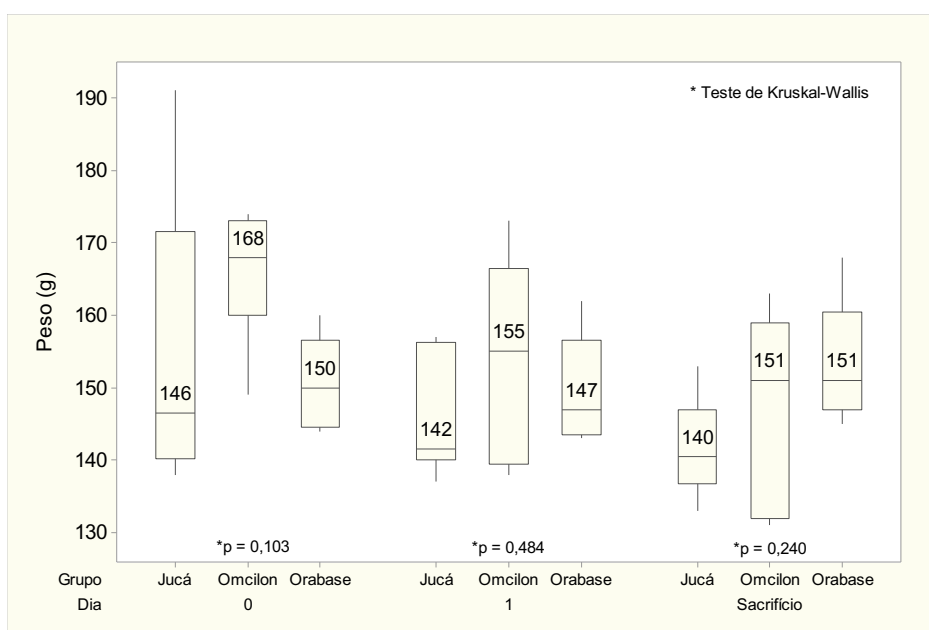


Gráfico 3 - Comparação dos pesos em relação aos grupos em três diferentes momentos, Manaus - AM.

5.8.3 Escores Histológicos

O gráfico 4 demonstra que no primeiro dia de análise os animais apresentaram úlceras com padrão histológico classificado como escore mediana 4, sem diferenças estatísticas entre os grupos analisados ($p=0,526$). A partir do quinto dia de análise, na comparação entre os grupos foram encontradas diferenças significativas entre o grupo Jucá e os grupos Omcilon e Orabase. Entretanto, os grupos Omcilon e Orabase apresentaram a mediana 3 e não diferiram entre si. No décimo dia de análise, observou-se menor escore histológico no grupo Jucá (mediana 0) seguido do grupo Orabase (mediana 1), ambos diferentes estatisticamente do grupo Omcilon (mediana 3).

Quando analisada a evolução dos escores de úlcera do primeiro ao décimo dia de cicatrização, o Grupo Jucá demonstrou diminuição significativa dos escores histológicos de úlceras entre os dias 1 e 5 e entre os dias 5 e 10. O grupo Orabase, por sua vez, não apresentou diminuição significativa entre os dias 1 e 5, porém demonstrou com diferença entre os dias 5 e 10. O grupo Omcilon, por fim, não demonstrou diminuição dos escores histológicos entre os dias 1 e 5 e os dias 5 e 10.

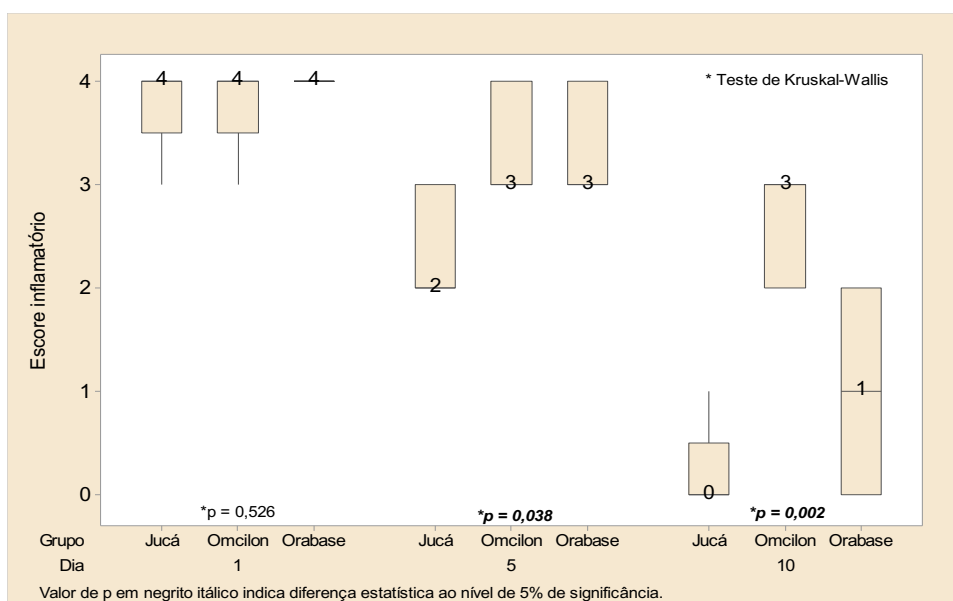


Gráfico 4 - Comparação dos escores em relação aos grupos nos diferentes dias, Manaus - AM.

Na figura 74, podemos observar os parâmetros histológicos das úlceras nos grupos estudados, com aumento de 200x. Ao analisar no dia 1, em todos os grupos verificou-se a mediana de score 4, apresentando um processo inflamatório agudo com a presença de vasos dilatados associado com infiltrado inflamatório com neutrófilos, o tecido epitelial escavado

produzido pela descamação do tecido inflamatório necrótico, com presença de células inflamatórias, leucócitos circulantes, predominantemente neutrófilos.

No dia 5, foi evidente a evolução cicatricial da lesão ulcerativa nos grupos, especialmente no grupo do Jucá (score 2), onde a úlcera se encontra com fibrose e inflamação crônica moderada (cicatrização tecidual pela substituição de tecido conjuntivo e moderada presença de macrófagos, linfócitos e plasmócitos). Entretanto, nos grupos do Omcilon e Jucá, com a mediana de score 3, apresentam um processo inflamatório crônico (tecido de granulação) com acúmulo focal de macrófagos desenvolvendo uma aparência epitelióide, cercado de infiltrado leucocitário, especialmente linfócitos.

No último dia de experimento (dia 10), observou-se a total recuperação cicatricial das lesões ulcerativas no grupo do Jucá (Figura 75g), onde o tecido conjuntivo apresenta-se completamente remodelado, sem alteração da superfície do epitélio, tecido sem escavação, presença de fibroblastos, fibrócitos, com abundância de fibras colágenas dispostas e orientadas paralelamente.

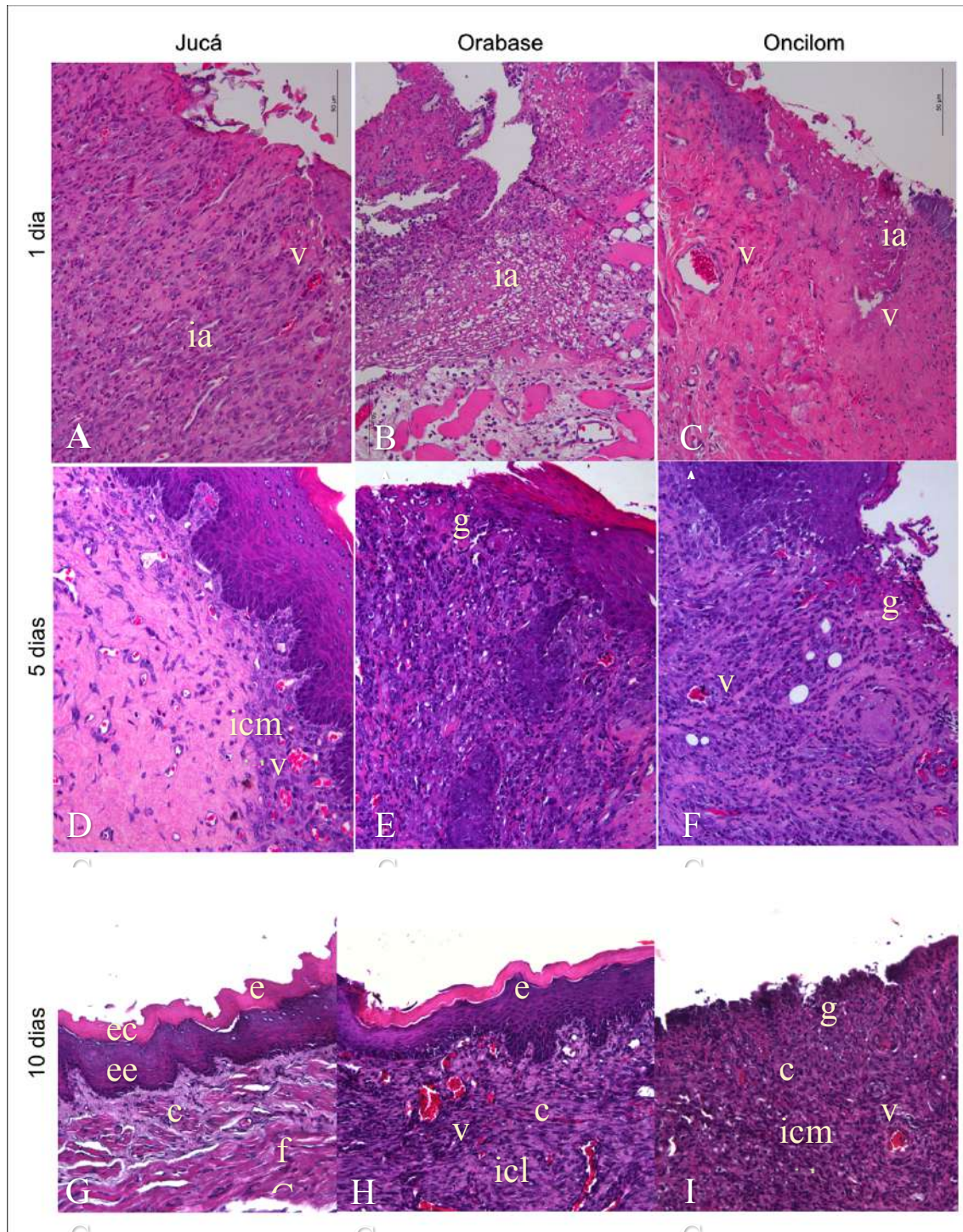


Figura 74 - Escores histológicos de úlceras traumáticas orais tratados com Oncilom, Orabase e Jucá nos dias 1,5 e 10. H&E. Aumento 200x.

Legenda – v: vasos sanguíneos ectásicos; f: fibras colágenas; e: tecido epitelial remodelado; ec: estrato córneo; ee: estrato espinhoso; c: tecido conjuntivo; icl: infiltrado inflamatório crônico leve; icm: infiltrado inflamatório crônico moderado; ia: infiltrado inflamatório agudo; g: tecido de granulação.

6. DISCUSSÃO

Novas pesquisas de inovação tecnológicas farmacêuticas tornaram-se crescente nos últimos anos devido a grande tradição popular aos produtos à base de plantas, principalmente nos países subdesenvolvidos, onde os medicamentos industrializados, ainda são, economicamente inacessíveis a grande parcela da população. À vista disso, pesquisas fazem-se necessárias para garantir que estas formulações tenham eficácia e segurança comprovadas. Porém, para que uma matéria-prima vegetal se torne um produto farmacêutico acabado, uma série de protocolos relacionados à extração do produto; garantia de estabilidade das propriedades farmacológicas; forma de armazenamento e obtenção de uma padronização final devem ser obedecidos rigorosamente (AKKARI *et al.*, 2016; FARIAS, 2001; SIMOES *et al.*, 2007).

Os testes utilizados para o controle de qualidade dos produtos fitoterápicos são os mesmos utilizados para os medicamentos industriais, nos quais as análises são realizadas a fim de obter dados sobre os aspectos biológicos, químicos, físico-químicos, botânicos e microbiológicos tanto da matéria-prima vegetal, quanto dos seus adjuvantes tecnológicos, materiais de acondicionamento e na forma farmacêutica padronizada, em fase de processamento e em fase final (GIL, 2007).

Ao propor uma formulação, acredita-se que os adjuvantes farmacêuticos são inertes, porém em um extrato vegetal contendo várias substâncias, a probabilidade de que uma interação química entre o extrato e os adjuvantes venha a desestabilizar as preparações é bem maior que em outros casos (NASCIMENTO, 2005). A escolha dos excipientes adequados para qualquer formulação deve se basear nas características do princípio ativo, bem como na sua compatibilidade com os demais componentes da formulação, pois de fato, interações entre princípio ativo e excipientes podem afetar a natureza química, a estabilidade da formulação, e, consequentemente, sua eficácia e segurança (TAGLIARI *et al.*, 2008).

A árvore adulta de *L. ferrea* L. é descrita como vegetação pequena a mediana de até 10 metros de altura, muito predominante na vegetação da caatinga, sertão nordestino e introduzida na região amazônica a partir de imigrantes (PRANCE; SILVA, 1975). Seus frutos são verdes enquanto imaturos e marrom após maturação, levemente achatado e sinuoso com sutura ventral saliente, além de possuir base arredondada a curvada e ápice arredondado. A casca do caule, por sua vez, apresenta-se como matéria-prima disponível para coleta todo o ano, eliminando

um fator crítico de sazonalidade inerente ao processo de frutificação (GALDINO, MESQUITA; KOSSMANN, 2007).

O presente estudo utilizou o extrato hidroalcoólico da casca do caule obtidos a partir do método de decocção por refluxo. A metodologia utilizada contrapõe a metodologia proposta por Oliveira *et al.* (2013) cujo qual preparou o extrato através da técnica de infusão, bem como por Conde *et al.* (2016), na qual a extração foi realizada por percolação a temperatura ambiente, utilizando o metanol como líquido extrator. Quando da comparação 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.

A literatura descreve algumas propriedades terapêuticas dos compostos químicos encontrados na *L. ferrea* L., e através de ensaios farmacológicos, demonstraram atividade antimicrobiana, bem como propriedades anti-inflamatórias (inibindo a síntese de prostaglandinas inflamatórias) e cicatrizantes (CARVALHO *et al.*, 1996; SAMPAIO *et al.*, 2009). Kobayashi *et al.* (2015) e Magalhães *et al.* (2015) analisaram o perfil fitoquímico da *L. ferrea* revelando a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos, sesquiterpenolactonas e antraquinonas, dentre outros. No presente estudo, foram encontrados a presença de diversos compostos químicos, dentre os quais estão os três majoritários: ácido gálico, ácido elágico e rutina, corroborando com os achados dos estudos supracitados.

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, sugerem que os taninos têm a capacidade de formação de uma barreira mecânica o que age auxiliando a cicatrização de úlcera como demonstrado por Vasconcelos *et al.* (2010), o que pode estar relacionado com os resultados do presente estudo no que se refere à atividade cicatricial da formulação a base de Jucá.

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. a 2% 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 a mucosa, foi escolhido a carboximetilcelulose (CMC) por ter compatibilidade com outros componentes da formulação. Estudos relataram que apesar do CMC ser um ótimo polímero para aderência de mucosas, existem outros disponíveis para serem utilizados em formulações oleosas, dentre eles a maltodextrina (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, 2004). 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, 2004). Logo, a partir dos resultados obtidos da formulação proposta os testes de controle de qualidade apresentaram estabilidade química, física e microbiológica pelo período proposto no presente estudo, 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 qual apresentou contaminação bacteriana/fúngica em 60 dias de experimento.

A determinação da densidade relativa e de massas é de extrema importância para avaliação da estabilidade da formula farmacêutica. Quanto mais próxima a formulação tiver da densidade da água mais estável ela se torna, conseqüentemente melhor a incorporação do princípio ativo e maior teor do princípio ativo, sem perda de propriedades terapêuticas (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2010), o que corrobora com os resultados encontrados no presente estudo, sugerindo uma ótima estabilidade da formulação nos tempos e condições de armazenamento testados.

Quanto a avaliação do pH, a determinação do pH da formulação permite observar se a formulação apresenta degradação ou não com o armazenamento. O pH deve ser compatível com a área fisiológica destinada (MARAFON *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2013). No presente estudo, a média de pH encontrada nos diferentes tempos e locais de armazenamento

demonstraram estabilidade da formulação, com pH entre 6,01 a 6,67, corroborando com os achados encontrados na determinação da densidade e pH da pomada orabase de *L. ferrea* L. a 2%. No trabalho realizado por Matos (2016) que determinou o controle de qualidade de uma formulação orabase de *L. ferrea* L. os achados de médias de pH não corroboraram com as médias do presente estudo, a nova formulação proposta demonstrou resultados bem mais satisfatórios, com o pH perto da neutralidade, compatíveis com a área fisiológica destinada. Por isso, a determinação do pH é um importante indicador funcional, pois a cavidade bucal apresenta um pH levemente ácido, próximo da neutralidade (em torno de 7) o que contribui para proteção bacteriana e fúngica, além de manutenção da capacidade tamponante e cicatricial, visto que o pH próximo a neutralidade esta diretamente relacionado ao processo de regeneração tecidual (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; LEONARDI; GASPAR; CAMPOS, 2002).

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 avaliação.

As úlceras aftosas são umas das afecções crônicas orais mais comuns, apesar de hoje ter uma etiologia idiopática, acredita-se que a destruição tecidual local parece ser uma resposta tecidual mediadas por linfócitos T, onde exibem uma zona central de ulceração recoberta por uma membrana fibrinopurulenta. As reações inflamatórias compartilham as mesmas características mesmo que advindas de diferentes estímulos, onde demonstram histopatologicamente uma zona de ulceração. Abaixo da área ulcerativa o tecido conjuntivo exibe um aumento na vascularização e infiltrado inflamatório misto, que consiste em linfócitos, histiócitos e leucócitos polimorfonucleares (NEVILLE *et al.*, 2009).

Durante a fase de processo cicatricial que pode variar de 10 a 14 dias, há presença de formação de tecido de granulação que corresponde ao primeiro produto de crescimento fibroblástico e endotelial, conferindo uma barreira física a lesão ulcerativa.

Oliveira *et al.* (2010) avaliaram os efeitos do tratamento tópico da *L. ferrea* L. em feridas cutâneas de caprinos. As avaliações das feridas foram feitas do ponto de vista clínico, bacteriológico, morfométrico e histopatológico nos períodos pré-determinados (7, 14 e 21 dias). Os resultados obtidos demonstraram que a utilização tópica da pomada apresentou eficiência significativa no auxílio da reparação cicatricial de feridas cutâneas de caprinos sem apresentar toxicidade. Resultados semelhantes foram encontrados por SOARES *et al.* (2013), onde 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 um poder cicatrizante quando comparado ao grupo controle utilizado.

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. O que corrobora com os achados durante a avaliação experimental deste estudo onde no primeiro dia de avaliação, os três grupos (Jucá, Orabase e Oncilom®) apresentaram escores histológicos semelhantes (escore 4), onde foi visualizado a presença de extensa área de ulceração associada a presença de membrana fibrinogranulocítica, intenso infiltrado inflamatório com polimorfonucleares neutrófilos, vasos sanguíneos ectásicos, edema e áreas de necrose. No 5º dia de avaliação, os grupos Orabase e Oncilom® continuaram apresentando extensas áreas de ulceração associadas a membrana fibrinogranulocítica, com presença de infiltrado inflamatório ora agudo ora misto, com presença de vasos sanguíneos ectásicos. No grupo Jucá, entretanto, foi visualizado, por vezes, presença de recobrimento por epitélio e/ou tecido conjuntivo apresentando infiltrado inflamatório crônico, com presença de células mononucleares e áreas de deposição de fibras colágenas. No 10º dia de análise, foram vistos nos grupos Juca e Orabase regiões de recobrimento epitelial, associada, por vezes, a leve infiltrado inflamatório crônico. Enquanto isso, no grupo Oncilom, ainda foram visualizadas áreas de descontinuidade de epitélio associadas com infiltrado inflamatório misto.

As células presentes durante o processo inflamatório são de extrema importância para reparação tecidual, pois atuam contra a contaminação da área lesionada por agentes externos, promovendo toda proliferação e remodelação tecidual. Contudo a persistência destas células pode ocasionar no atraso de reparação gerando sintomatologia dolorosa e formação de tecido fibrótico exuberante (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; KRYCZKA & BONCELA, 2015). Este achado pode ter relação com a avaliação do peso corpóreo, no presente estudo, todos os animais ganharam peso durante o período do estudo, apesar de não apresentarem diferenças estatísticas significativas entre os grupos. Porém, é importante notar que no grupo tratado com Omcilon ocorreu menor ganho de peso em relação aos outros grupos, bem como foi o que apresentou maior tempo de cicatrização, demonstrando que o tempo de cicatrização de úlceras bucais pode influenciar na capacidade de alimentação dos animais.

Durante o processo cicatricial, as células multiplicam-se e migram-se participando ativamente na formação do tecido de granulação, os fibroblastos são as células mais abundantes

do tecido conjuntivo, produzindo grande parte da matriz extracelular (MEC) que o compõe como colágeno tipo I e II e elastina além de outras proteases responsáveis pela remodelação da MEC (SHAW & MARTIN, 2009; ISAAC *et al.*, 2010; KENDAL & FEGHALI-BOSTWICK, 2014). Esta característica pode ser observada principalmente no último dia de avaliação experimental (dia 10) no grupo tratado com a pomada orabase de *L. ferrea* L.

Ao comparar os grupos incluídos nos testes deste estudo e analisar os resultados, evidencia-se a eficácia da pomada orabase a base de *L. ferrea* L. proposta para a cicatrização das úlceras orais. Os ratos do grupo teste apresentaram processo cicatricial mais rápido e eficiente em relação aos demais grupos. A utilização de *Libidibia ferrea* L. no tratamento de feridas mostra-se benéfico, principalmente nos primeiros dias pós-operatório, 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 comprovada em literatura (BRASIL, 2016; Kobayashi *et al.*, 2015; Oliveira *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013). Não existem trabalhos publicados demonstrando a atividade cicatricial de formulações orabase de *L. ferrea* L. para tratamento de lesões ulcerativas.

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se concluir que:

- Pôde-se, possivelmente, determinar a presença de três compostos majoritários através do controle analítico em HPLC, dentre eles: ácido gálico, ácido elágico e rutina.
- A formulação testada apresentou estabilidade físico-química em todos os tempos e condições de armazenamento, sem alteração de cor, odor e consistência, elevada viscosidade e ausência de contaminantes bacterianos e/ou fúngicos.
- Houve redução significativa das úlceras tratadas com a pomada orabase de *L. ferrea* L. a 2% quando comparada aos demais grupos, comprovando a atividade cicatricial da formulação fitoterápica proposta quando utilizada para tratamento de úlceras bucais.

8. REFERÊNCIAS

- 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.
- ALLEN Jr LV, POPOVICH NG, ANSEL HC. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- 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:UFV, 2005.
- ALONSO JR. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. ISIS edicionaes, 1998.
- 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 APN. Modelo experimental de úlcera traumática em mucosa jugal de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira.* 26(3), 2011.
- ANVISA. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. Brasília, 2003.
- ANVISA. Consolidado de normas da coordenação de fitoterápicos, dinamizados e notificados. Brasília, 2013.
- BALBACH A. As plantas que curam. 2. Ed. São Paulo: Editora Missionária, 1992.
- 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.

- BAUER AW, KIRBY WM, SHERRIS JC, TURCK M. Antibiotic susceptibility 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 aphthous stomatitis. A literature review. *J Clin Exp Dent*. 6(2):168-174, 2014.
- BERKOWITZ BA. Avaliação básica e clínica de novas drogas. In: KATZUNG BG. *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 farmácia. *Archives of oral research*. 7(1): 89-97, 2011.
- 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 política nacional. *Cad Saúde Pública*. 23(6):1463-1471, 2007.
- BRAGANÇA ALR. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. Niterói: EDUFF, 1996.
- BRANDAO MGL, FREIRE N, VIANNA-SOARES CD. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. *Cad Saude Pública*. (14)2: 693-700, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. Brasília: ANVISA, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria 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 nº 89 DE 16 de Março de 2004. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 1 de 29 de Julho de 2005. Brasília: ANVISA, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 67 de 8 de Outubro de 2007. Brasília: ANVISA, 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 nº 17 de 16 de Abril de 2010. Brasília: ANVISA, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 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. Farmacopeia Brasileira. V. 2. Brasília: ANVISA, 2010c.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 13 de 14 de Março de 2013. Brasília: ANVISA, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26 de 13 de Maio de 2014. Brasília: ANVISA, 2014.

BRASILEIRO FILHO G. Patologia Geral. 2.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

BRUNING MCR; MOSEGUI GBG; VIANNA CMM. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. Ciências & Saúde Coletiva. 17(10):2675-2685, 2012.

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.

BYRNE LT. In: Bioactive Natural Products: detection, isolation and structure determination. CRC Press, 1993.

CALIXTO JB. Biodiversidade como fonte de medicamentos. Cienc. Cult. (55)3: 37-39, 2003.

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.

CARVALHO JCT, TEIXEIRA JR, SOUZA PJ, BASTOS JK, dos SANTOS FILHO D, SARTI SJ. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. J Ethnopharmacol. (53): 175-178, 1996.

- CARVALHO ACB, BALBINO EE, MACIEL ARTUR, PERFEITO JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 18(2): 314-319, 2008.
- 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 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.
- CASTILHO AR. Produtos Naturais em odontologia. *Revista Saúde*. (1)1: 11-19, 2007.
- CAVALHEIRO MG, FARIAS DF, FERNANDES GS, NUNES EP, CAVALCANTI FS, VASCONCELOS IM, MELO VMM, CARVALHO AFU. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. *Rev Bras Farmacogn*. 19(2B): 586-91, 2009.
- 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.
- CHO SA, PARK JH, SEOK SH, JUHN JH, KIM SJ, JI HJ, CHOO YS, PARK JH. Effect of granulocyte macrophage-colony stimulating fator (GM-CSF) on 5-FU-induced ulcerative mucositis in hamster buccal pouches. *Exp Toxicol Pathol*. (57)4: 321-328, 2006.
- 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*. V.38: 241-253, 2009.
- CONDE NCO. Avaliação da atividade antimicrobiana de plantas da Amazônia sobre bactérias do biofilme dental. Tese (Doutorado em estomatologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

- CONDE NCO, PEREIRA MSV, BANDEIRA 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.
- COPETTI FB, GRIEBELER SA. Análise da adequação da rotulagem de medicamentos fitoterápicos. *Pharmacia Brasileira*. V.17. N.7/9: 60-63, 2005.
- DI STASY LC, HIRUMA-LIMA CA. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2.ed. São Paulo: Unesp, 2002.
- COSTA RPC, GUIMAREAS ALA, VIEIRA ACM. Avaliação da qualidade de amostras de plantas medicinais comercializadas no Brasil. *Rev Cienc Farm Basica Aplic*. 35(3): 425-433, 2014.
- EDDY NB, LEIMBACH D. Synthetic analgesics: dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J Pharmacol Exp Ther*. (107): 385-393, 1953.
- EDGAR NR, SALEH D, MILLER RA. Recurrent Aphthous Stomatitis: a review. *Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. V. 10. N.3: Março, 2017.
- ELDIN S, DUNFORD A. Fitoterapia na atenção primária a saúde. São Paulo: Manole, 2001.
- 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.
- FARIAS MR. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES CMO, 2001.
- FRANCISCO KS. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. *Revista Saúde*. (4)1: 18-24, 1996.
- GALDINO G, MESQUITA MR, KOSSMANN IDF. Descrição morfológica da plântula e diásporos de *Caesalpinia ferrea* Mart. *Revista Brasileira de Biociências*. (5)2: 747-749, 2007.
- GEBARA ECE, ZARDETTO CGDC, MAYER, MPA. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S. mutans* e *S. sobrinus*. *Rev Odontol Univ*. (10)4: 251-256, 1996.
- GIL ES. Controle físico-químico de qualidade de medicamentos. *Pharmabooks*. (2): 27-41, 2007.
- GONZALES FG, BARROS SBM, BACCHI EM. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* mart. *Braz J Pharmac Sci*. (40)1: 79-83, 2004.

- 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.
- 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 damascena mouthwash in the treatment of recurrent aphtous stomatitis: a randomized, double-blinded, 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 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.
- KENDALL R, FEGHALI-BOSTWICK C. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators. *Frontiers in Pharmacology*. (5)123: 2014.
- 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.
- KLEIN T, LONGHINI R, BRUSCHI ML, MELLO JCP. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Ver Cienc Farm Basica Apl*. 30(3):2410248, 2009.

- 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.
- KRYCZKA J, BONCELA J. Leukocytes: The Double-Edged Sword in Fibrosis. Mediators of Inflammation, 2015.
- LEWIS G, SCHIRIRE B, MACKINDER B, LOCK M. Legumes of the world. Royal Botanic Gardnes: Kew, 2005.
- 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.
- LIMA JUNIOR JF, SOUZA ECF. Situando a toterapia frente às racionalidades médicas ocidentais contemporâneas. KEW:577, 2005.
- LIMA JUNIOR JF, DIMENSTEIN M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: visão do odontólogo. Saúde Rev. (8):1937-1944, 2006.
- 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.
- MARCUCCI G. Fundamentos de odontologia: estomatologia. São Paulo: Guanabara Koogan, 2005.
- MARREIRO RO, BANDEIRA MFCL, SOUZA TP, ALMEIDA MC, BENDAHAM K, VENANCIO GN, RODRIGUES IC, COELHO CN, MILERIO PSL, 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.
- MATOS FJA. Introdução à fitoquímica experimental. Editora UFC, 1998.
- 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.
- 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.
- 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.
- NASCIMENTO, JE. Produtos à base de plantas medicinais comercializados em Pernambuco - nordeste do Brasil. Acta Farmacêutica Bonaerense. (24)1: 113-22, 2005.
- NASCIMENTO JUNIOR BJ, TINEL LO, SILVA ES, RODRIGUES LA, FREITAS TON, NUNES XO, AMORIM ELC. 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. Rev Bras Pl Med. (18)1:517-522, 2015.
- NASRY SA, SHENAWY HM, MOSTAFA D, AMMAR NM. Different modalities for treatment of recerrent aphtous stomatitis: a radomized clinical trial. J Clin Exp Dent. 8(5): 517-522, 2016.
- NEVILLE B, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JJ. Patologia oral & maxilofacial. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- NOGUEIRA MJC. Fitoterapia popular e enfermagem comunitária. Tese (Livre docência). São Paulo (USP), 1983.
- OLIVEIRA MJR, SIMOES MJS, SASSI CRR. Fitoterapia no Sistema de Saul de Pública (SUS) no estado de São Paulo, Brasil. Ver 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 Mediciniais.V.12. N.3: 302-310, 2010.
- OLIVEIRA GP, SOUZA TP, CAETANO SK, FARIAS KS, VENANCIA GN, BANDEIRA MFCL, CONDE NCO. Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos dda casca do caule e da vagem de *Libidibia ferrea* L. frente a microrganismos da cavidade bucal. Revista Fitos. 8(2): 73-160, 2013.
- 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.
- 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.
- PRANCE GT, SILVA MF. Árvores de Manaus. INPA, Manaus, 1975.
- RATES SMK. Plants as source of drugs, Toicon 39: 603-613, 2001.
- REGEZI JA, SCIUBBA JJ, JORDAN RCK. Oral Pathology: clinical pathologic correlation. 4.ed. St Louis: W. B. Saunders, 2003.
- 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. V.124: 289-294, 2009.
- 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.

- SCHLEMPER V, .Antispasmodic effects of hydroalcoholic extract of *Marrubium vulgare* on isolated tissues. *Phytomedicine*. (3)2: 211-216, 1996.
- SCULLY YC, GORSKY M, LOZADA-NUR F. Aphthous ulcerations. *Dermatologic Therapy*. (15): 185-205, 2002.
- SHAW T, MARTIN P. Wound repair at a glance. *J Cell Sci*, (15)122: 3209-3213, 2009.
- SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMAN G, MELLO JCP, MENTZ LA, PETROVICK PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007.
- SCHAFER M, WERNER S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*. (58) 2: 165-171, 2008.
- SIMÕES CAGG, CONDE NC, VENANCIA GN, MILERIO OS, BANDEIRA MF, da VEIGA JUNIOR VF. Antibacterial activity of Copaiba oil gel on dental biofilm. *The Open Dentistry Journal*. (10): 2016.
- SILVA FMA, HANNA ACS, SOUZA AA, FILHO FAZ, CANHOTO OMF, MAGALHAES A, BENEVIDES PJC, AZEVEDO MBM, SIANI AC, POHLIT AM, SOUZAB ADL, KOOLEN HHF. Integrative analysis based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* biomass residues: determination of ellagic acid derivatives. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. (30)4: 830-836, 2019.
- SOARES JA, de BARROS M, GONÇALEZ WP, CRISCIAR, 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.
- SOUZA GB. *Formulário farmacêutico magistral*. 1.ed. São Paulo: Medfarma, 2016.
- SOUZA LAG, SILVA MF, MOREIRA FMS. Associações rizóbios-arbóreas na Amazônia. In: NODA H, SOUZA LAG, FONSECA OJM. *Duas décadas de contribuições do INPA à pesquisa agrônômica 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.
- 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.
- TAGLIARI MP, STULZER HK, KELMANN RG, KUMINEK F, SILVA MAS. Estabilidade térmica e compatibilidade da hidroquinona. *Cosmet Toilet*, (20): 50-53,

2008.

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

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.

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

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

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

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

WHO. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant material. Geneva, 1998.

YUNES RA, PREDROSA RC, CECHINEL FV. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Química Nova. 24(1): 147-152, 2001.

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

9. ANEXOS

9.1 Anexo A – Aprovação da pesquisa pelo CEUA/UFAM.



Poder Executivo
Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Protocolo nº 007/2015– CEUA / UFAM, intitulado como "Controle de qualidade físico- químico e efeito cicatricial de uma formulação de orabase de Libidiba ferrea (ex Caesalpinia férrea) para cicatrização de úlceras em cavidade bucal", sob a orientação da **Dra. Nikeila Chacon de Oliveira** Conde e do colaborador Dr. José Fernando Marques Barcellos e na responsabilidade de Anselmo Júnio Pedroso Matos, mestrando do Programa de Pós- Graduação em Odontologia- UFAM, está de acordo com a Legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEa-UFAM).

Manaus, 05 de abril de 2017.

Profª. Dra. Cinthya Iamile Frithz Brandão de Oliveira
Presidente do CEUA-UFAM

Portaria 1595/2014 - GR

9.2 Anexo B - Aprovação da pesquisa pelo CEUA/UFC.



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito cicatricial de uma formulação de pomada orabase de (Libidibia ferrea ex. Caesalpinia ferrea L.) para a cicatrização de úlceras da cavidade oral.", protocolada sob o CEUA nº 8625270218 (ID 000200), sob a responsabilidade de **Ana Paula Negreiros Nunes Alves e equipe; Antonio Ernando Carlos Ferreira Junior** - 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 26/04/2018.

We certify that the proposal "Effect on the healing of an oral ointment formulation (Libidibia ferrea ex. Caesalpinia ferrea L.) for the healing of oral cavity ulcers.", utilizing 84 Heterogenics rats (84 males), protocol number CEUA 8625270218 (ID 000200), under the responsibility of **Ana Paula Negreiros Nunes Alves and team; Antonio Ernando Carlos Ferreira Junior** - 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 04/26/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **04/2019** Área: **Departamento de Clínica Odontológica**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **84**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **180 a 220 g**

Local do experimento: Biotério de Experimentação do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC

Fortaleza, 20 de junho de 2018

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Virginia Cláudia Carneiro Girão

Profa. Dra. Virginia Cláudia Carneiro Girão
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

9.3 Anexo C - Descrição referente ao Parâmetro Histológico.

PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	
CLASSIFICAÇÃO	REFERÊNCIA/DESCRIÇÃO
0	Sem úlcera / tecido conjuntivo remodelado. Sem alteração da superfície do epitélio, tecido sem escavação. Presença de fibroblastos, fibrócitos, abundância de fibras colágenas dispostas paralelamente e fibras orientadas paralelamente.
1	Sem úlcera / fibrose + ligeira inflamação crônica. Sem alteração da superfície do tecido epitelial, tecido sem escavação. Cicatrização pela substituição de tecido conjuntivo e presença de poucos mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos. Tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, efetuando através da proliferação de pequenos vasos (angiogênese) e, em particular, fibrose.
2	Com úlcera / fibrose + inflamação crônica moderada. Epitélio com defeito local, ou escavação, da superfície do tecido, produzido pela esfoliação (descamação) do tecido inflamatório necrótico. Cicatrização pela substituição de tecido conjuntivo (fibrose) e moderada presença de mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos.
3	Com úlcera / processo de inflamação crônica (tecido de granulação). Epitélio com defeito local, ou escavação, da superfície do tecido, produzido pela esfoliação (descamação) do tecido inflamatório necrótico. Acúmulo focal macrófagos ativados desenvolvendo uma aparência epitelióide, cercados por um colar de leucócitos mononucleares, especialmente linfócitos e, ocasionalmente plasmócitos.
4	Com úlcera / processo agudo (vasos dilatados, misturado infiltrado inflamatório com neutrófilos). Epitélio com defeito local, ou escavação, da superfície do tecido, produzido pela esfoliação (descamação) do tecido inflamatório necrótico. Presença de células inflamatórias, macrófagos, leucócitos circulantes, predominantemente neutrófilos.