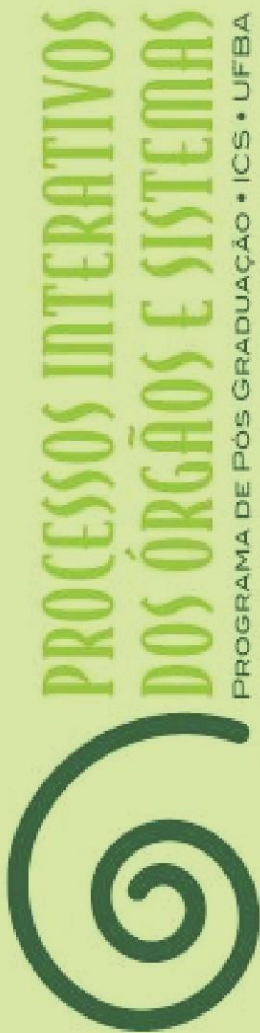


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

TILA FORTUNA COSTA FREIRE

ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO USO DA *MATRICARIA
RECUTITA* E DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM MUCOSA
ORAL DE RATOS



Salvador
2022



PROCESSOS INTERATIVOS
DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO • ICS • UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS
INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS**

TILA FORTUNA COSTA FREIRE

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO USO DA *MATRICARIA
RECUTITA* E DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM MUCOSA
ORAL DE RATOS**

Salvador
2022

TILA FORTUNA COSTA FREIRE

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO USO DA *MATRICARIA
RECUTITA* E DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM MUCOSA
ORAL DE RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Gabriela Botelho Martins

Salvador
2022

F866 Freire, Tila Fortuna Costa.
Análise histomorfométrica do uso da *Matricaria recutita* e da
fotobiomodulação laser em mucosa oral de ratos/Tila Fortuna Costa Freire.
– Salvador, 2022.
137 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gabriela Botelho Martins.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências
da Saúde/Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos
e Sistemas, 2022.

Inclui referências e anexos.

1. Camomila Matricaria. 2. Terapia com luz de baixa intensidade.
3. Terapia a laser. 4. Mucosa bucal. I. Martins, Gabriela Botelho.
II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 621.375.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
Instituto de Ciências da Saúde



TERMO DE APROVAÇÃO DO DEFESA PÚBLICA DE TESE

TILA FORTUNA COSTA FREIRE

**ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA DO USO DA MATRICARIA RECUTITA E DA
FOTOBIMODULAÇÃO LASER EM MUCOSA ORAL DE RATOS**

Salvador, Bahia, 18 de março de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA:

DocuSigned by:

Gabriela Botelho Martins Oliveira Souza

7440D4DD49FE47E

PROFA. DRA. GABRIELA BOTELHO MARTINS OLIVEIRA SOUZA (Examinada Interna)

DocuSigned by:

Alena Ribeiro Alves Peixoto Medrado

7B2BEE470A4241A

PROFA. DRA. ALENA RIBEIRO ALVES PEIXOTO MEDRADO (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

Mãnoela Carrera

2B7A301260DC74E2

PROFA. DRA. MÃNOELA CARRERA MARTINEZ CAVALCANTE PEREIRA (Examinadora Interna)

DocuSigned by:

Daniela Nascimento Silva

B6E16C023603476

PROFA. DRA. DANIELA NASCIMENTO SILVA (Examinadora Externa)

DocuSigned by:

Márcio Campos Oliveira

C36B2A50214C443

PROF DR MÁRCIO CAMPOS OLIVEIRA (Examinador Externo)

À minha Ana, que nem havia chegado quando este projeto se iniciou,
mas hoje é a razão de tudo.

AGRADECIMENTOS

Aproveito este espaço para dedicar os agradecimentos referentes à confecção deste trabalho única e exclusivamente ao meu Senhor: **Jesus Cristo**, por ter me colocado aos cuidados de meus amáveis pais **Celso** e **Thelma** aqui neste mundo, grandes exemplos de vida para mim.

Por ter me concedido a companhia de duas irmãs confidentes: **Tiara** e **Taisa**.

Pelo convívio com minha querida avó **Detezinha** até a presente data.

Por permitir a entrada de meu parceiro de vida, **Vockton**, peça fundamental em minha rotina diária e junto com ele a chegada de meus sogros: **Maria do Carmo** e **Vockton**.

Por me conceder a inigualável bênção de ser mãe da mocinha mais incrivelmente alegre e musical que eu já conheci: minha **Ana**.

Por me presentear com a presença de pessoas tão importantes na minha vida como meus cunhados **Gabriel**, **Alex**, **Volfer** e **Jana**, tios, primos e amigos que eu aprendi a amar ao longo dos anos e que se tornaram essenciais para mim: **tia Márcia**, **tia Fê**, **tia Rei**, **tia Buia**, **Lai**, **amigas de infância**, da **Escola Bahiana**, da **residência** e também do **mestrado**.

Por ter iluminado a mente de minha “mãe-científica”, com quem trabalhei da graduação ao mestrado, **Prof^a Alena Medrado**, para me guiar até minha atual orientadora: **Prof^a Gabriela Martins**, que me acolheu com toda sua simpatia, paciência e competência, me ensinando além dos conhecimentos científicos, através da sua parceria e humildade. Conquistou em mim um lugar especial e o título de “madrinha-científica”.

Por colocar ao meu redor durante esses 4 anos, pessoas especiais que me ajudaram a carregar o fardo desse projeto de maneira suave e divertida, que se tornaram verdadeiras amigas ao longo desses anos: **Juliana Borges**, **Ana Carla Barletta**, **Hortência Dela Cella** e **Bruna Neri**.

Por tocar a vida de tantas pessoas, que ajudaram de forma direta e indireta a chegar ao produto deste trabalho: **Prof Roberto Paulo Correia de Araújo** (ICS), que me acolheu como orientador no início dessa trajetória, **Prof^a Elisângela Campos** (ICS) sempre um grande exemplo de inspiração para a nossa equipe, **Prof^a Rejane Santana** (ISC), **Prof^a Tarsila Freitas** (UEFS), **Eron** (UEFS), **Dr Cláudio Pereira** (FIOCRUZ), **Fábio**

Menezes (FADBA), Beatriz Frota (ICS), Rafaela Oliveira e Natália Odilon (ICS), o ex-aluno Pedro Igor Melo e o querido Diogo Martins por tanto apoio durante esses anos de pesquisa.

Por ter me concedido a oportunidade de integrar o **Núcleo de Estudos em Oncologia (NEO)** e conviver com pessoas diferenciadas que sempre têm algo a acrescentar à minha vida.

Por ter aberto portas em tantos locais, como o **Laboratório de Bioquímica Oral do ICS/UFBA, o Laboratório de Patologia Bucal da UEFS e o Laboratório de Histologia e Embriologia da FADBA**, sem os quais este trabalho não teria sido realizado.

Pelo meu ingresso no **Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas**, e ter colocado pessoas tão solícitas: **Carlos, Célia, Tarcísio e Alyson**, sempre dispostos a ajudar e resolver possíveis questões.

Te agradeço, meu Senhor, por todo o teu amor e cuidado na minha vida.

Freire TFC. Análise histomorfométrica do uso da *Matricaria recutita* e da fotobiomodulação laser em mucosa oral de ratos [tese]. Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia: Salvador; 2022. 137p.

RESUMO

Introdução: Devido às suas propriedades biológicas, a camomila (*Matricaria recutita*) vem sendo empregada na cicatrização de feridas. No entanto, seu efeito sobre a mucosa oral normal, bem como sua associação com a terapia de fotobiomodulação com laser (TFBML) ainda não foram documentados. **Objetivo:** Verificar o padrão tecidual da mucosa oral normal sob ação tópica da camomila e avaliar o reparo de úlcera experimental produzida mecanicamente em mucosa oral após o uso tópico da camomila isoladamente ou associada à TFBML. **Métodos:** Ratos machos *Wistar* foram submetidos ao uso tópico de camomila aplicada em mucosa jugal normal e em ferida cirúrgica de 5mm de diâmetro confeccionada em dorso de língua, bem como avaliados quanto à aplicação da camomila em tecido normal (mucosa jugal). Os animais foram alocados nos grupos experimentais: *Baseline*, Controle, Camomila Extrato fluido, Camomila Infusão 1, Camomila Infusão 2, Laser, Laser + Camomila Infusão. A eutanásia foi programada para os dias 3, 7 e 14 após procedimento cirúrgico. Análises clínica, morfológica e morfométrica foram realizadas em Hematoxilina e Eosina e Sírius Vermelho. **Resultados:** Não foram observadas alterações clínicas na mucosa jugal normal onde ocorreu aplicação tópica da camomila. As características morfológicas e morfométricas avaliadas demonstraram semelhança entre os grupos experimentais e o grupo controle/*baseline*, sem diferenças estatísticas entre eles. Ao se comparar as terapêuticas escolhidas no reparo da úlcera em dorso de língua, notou-se que, de maneira geral, os grupos Extrato fluido e Laser foram capazes de modular significativamente as variáveis correspondentes às fases exsudativa e proliferativa do reparo tecidual, tanto clínica como histologicamente. Os grupos que utilizaram a camomila apenas sob infusão ou em associação ao laser, não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controle na maior parte dos parâmetros avaliados. **Conclusão:** A aplicação tópica da *M. Recutita*, sob diferentes formulações não provocou alterações clínicas ou histológicas no tecido de revestimento oral normal. Apesar da diferença nos parâmetros dos padrões clínicos, histológicos e histomorfométricos que evidenciou superioridade da TFBML nas análises realizadas, ambas as terapêuticas modularam positivamente as diferentes etapas do reparo da ferida cirúrgica, entretanto, com melhores resultados quando aplicadas isoladamente.

Palavras-chave: Camomila. *Matricaria*. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Terapia a Laser. Mucosa Bucal.

Freire TFC. *Análise histomorfométrica do uso da Matricaria recutita e da fotobiomodulação laser em mucosa oral de ratos* [tese]. Processos Interativos de Órgãos e Sistemas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia: Salvador; 2022. 137p.

ABSTRACT

Introduction: Due to its biological properties, chamomile (*M. recutita*) has been used in wound healing. However, its effect on normal oral mucosa as well as its association with laser photobiomodulation therapy (TFBML) has not been documented yet. **Objective:** To verify the tissue pattern of the normal oral mucosa under topical action of chamomile and to evaluate the repair of an experimental ulcer made in the oral mucosa after topical use of chamomile alone or associated with TFBML. **Methods:** Male *Wistar* rats were submitted to topical use of chamomile applied to normal buccal mucosa and to a 5mm diameter surgical wound made on the dorsum of the tongue, as well as being evaluated for the application of chamomile to normal tissue (buccal mucosa). The animals were allocated in the experimental groups: Baseline, Control, Chamomile Extract fluid, Chamomile Infusion 1, Chamomile Infusion 2, Laser, Laser + Chamomile Infusion. Euthanasia was scheduled for days 3, 7 and 14 after the surgical procedure. Clinical, morphological and morphometric analyzes were performed in Hematoxylin and Eosin and Red Sirius. **Results:** No clinical changes were observed in the normal cheek mucosa where chamomile was applied. The morphological and morphometric characteristics evaluated showed similarity between the experimental groups and the control/baseline group, with no statistical differences between them. When comparing the therapies chosen for ulcers' repair on the dorsum of the tongue, it was noted that, in general, the Fluid Extract and Laser groups were able to modulate the exudative and proliferative phases of tissue repair, both clinically and histologically. The groups that used chamomile only under infusion or in association with laser did not show significant differences in relation to the control group in most of the parameters evaluated. **Conclusion:** Topical application of *M. recutita* under different formulations did not cause clinical or histological changes in normal oral lining tissue. Despite the difference in the parameters of clinical, histological and histomorphometric patterns that showed superiority of TFBML in the performed analyses, both therapies positively modulated the different stages of surgical wound repair, however, with better results when applied alone.

Keywords: Chamomile. Matricaria. Low-Level Light Therapy. Laser Therapy. Mouth Mucosa.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** **Artigo 1 -** Fotomicrografias representativas de secções histológicas coradas por HE vistas na objetiva de 10x (A, C, E e G) e 40x (B, D, F e H) que ilustram a morfologia dos grupos experimentais. Percebe-se espessura do epitélio estratificado pavimentoso ortoceratinizado, com presença de cristas epiteliais (asterisco) ora volumosas, ora discretas. Observam-se também graus variados de espessura de camada córnea (ponta de seta), que caracterizam o padrão histomorfológico da mucosa jugal de ratos. Seta: vaso sanguíneo. Fonte: LBO/UFBA, 2022. 49
- Figura 2** **Artigo 1 -** Fotomicrografias representativas de secções histológicas coradas por Sírius Vermelho com objetiva de 10x (A, C, E, G) e 40x (B, D, F, H) para ilustrar o padrão morfológico das fibras colágenas nos grupos, onde se nota padronização de profundidade de deposição de colágeno (linhas interrompidas) na lâmina própria, com fibras densas (ponta de seta) dispersas em diferentes arranjos organizacionais. Fonte: LBO/ICS/UFBA, 2022. 50
- Figura 1** **Artigo 2 -** Fluxograma que representa as etapas do estudo. Fonte: LBO/UFBA, 2022. 66
- Figura 2** **Artigo 2 -** Fotomicrografias de secções histológicas (HE) na objetiva de 10x dos centros das úlceras, que demonstram os graus de re-epitelização dos grupos experimentais com 3, 7 e 14 dias. Observa-se que apenas o grupo G4 possuiu secções com re-epitelização parcial ainda no 3º dia (ponta da seta) e o grupo G5 exibiu formação inicial de epitélio em bordas da ferida (ponta da seta). Aos 7 dias, apenas os grupos G1 e G3 ainda exibiam presença de úlcera e persistência de infiltrado inflamatório (asterisco vermelho). Aos 14 dias, todos os grupos exibiram presença de fibroblastos (asterisco preto) e cobertura 76

epitelial completa. Porém, os grupos G2 e G4, apresentaram também re-epitelização completa e organizada, com diferenciação das papilas linguais (seta). n: necrose. e: edema. c: matriz colagênica. Fonte: LBO/UFBA, 2022.

- Figura 3** **Artigo 2 -** Fotomicrografias de secções histológicas (HE) na objetiva de 40x das úlceras, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos experimentais com 3, 7 e 14 dias. Nota-se que aos 3 dias, o grupo G4 exibe presença de fibroblastos (asterisco preto) e início da síntese de colágeno (c), enquanto os demais grupos apresentam edema (e), infiltrado inflamatório (asterisco vermelho), áreas de necrose (n) e presença de úlceras (ponta da seta). Aos 7 dias, os grupos G2 e G4 apresentam re-epitelização, celularidade tecidual (asterisco preto) e matriz colagênica (c). Aos 14 dias, todos os grupos apresentaram ausência de úlcera e os grupos G2 e G4, com re-epitelização completa e organizada, com diferenciação das papilas linguais (seta). h: extravasamento de hemossiderina. cruz preta: luz de vaso sanguíneo. Fonte: LBO/UFBA, 2022. 77
- Figura 4** **Artigo 2 -** Fotomicrografias representativas de secções histológicas (Sírius Vermelho) para ilustrar a expressão do colágeno com 14 dias nos grupos experimentais. HE, 10x (A, C, E, G, I) e 40x (B, D, F, H, J). Nota-se discreta diferença nos padrões morfológicos de deposição de colágeno (traços interrompidos), com variações de fibras mais delicadas (ponta de seta) a espessas (asterisco), o que interfere na intensidade da coloração utilizada e na resistência tênsil do tecido. Fonte: LBO/UFBA, 2022. 79
- Figura 5** **Artigo 2 -** Box plot da porcentagem de área de colágeno em função do grupo e do tempo. Fonte: LBO/UFBA, 2022. 83

LISTA DE TABELAS

| | | | |
|-----------------|-------------------|--|----|
| Tabela 1 | | Randomização dos animais nos grupos experimentais correspondentes ao Artigo 1 (LBO/UFBA, 2022). | 36 |
| Tabela 2 | | Randomização dos animais nos grupos experimentais correspondentes ao Artigo 2 (LBO/UFBA, 2022). | 36 |
| Tabela 1 | Artigo 1 - | Distribuição de frequências dos resultados das análises morfológicas em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022). | 51 |
| Tabela 2 | Artigo 1 - | Média e desvio padrão (DP) das medidas morfométricas (μm) em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022). | 53 |
| Tabela 3 | Artigo 1 - | Média e desvio padrão (DP) da porcentagem de área de colágeno em relação à área total do tecido em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022). | 54 |
| Tabela 1 | Artigo 2 - | Número de animais com úlcera/número total de animais no grupo (%), em cada grupo, no decorrer do tempo (LBO/UFBA, 2022). | 71 |
| Tabela 2 | Artigo 2 - | Média (desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) da medida em milímetros, inicial e final da úlcera, em função do grupo (LBO/UFBA, 2022). | 73 |
| Tabela 3 | Artigo 2 - | Distribuição de frequências dos resultados das análises morfológicas em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022). | 75 |
| Tabela 4 | Artigo 2 - | Média (desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) das medidas morfométricas lineares em função do grupo e do tempo (LBO/UFBA, 2022). | 81 |
| Tabela 5 | Artigo 2 - | Média (desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) da porcentagem de área de colágeno em função do grupo e do tempo (LBO/UFBA, 2022). | 82 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|---|
| a.C | Antes de Cristo |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BA | Bahia |
| cm | Centímetro |
| cm ² | Centímetro quadrado |
| CCI | Coefficiente de Correlação Intraclasse |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CHX | Clorexidina |
| CO ₂ | Dióxido de carbônico |
| COX | Ciclooxigenase |
| DACESE | Distância do ápice da crista epitelial para a superfície epitelial |
| DCBSE | Distância da camada basal à superfície epitelial |
| DI | Distância inter-cristas |
| DM | Diabetes mellitus |
| DNA | Do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucleico |
| ECC | Espessura da camada córnea |
| ECR | Ensaio clínico randomizado |
| EON | Espécies de oxigênio nítrico |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| <i>et al</i> | <i>et alii</i> (que traduzido significa e colaboradores) |
| EVA | Escala Visual Analógica |
| FADBA | Faculdade Adventista da Bahia |

| | |
|-------------------|---|
| FGF | Do inglês <i>fibroblast growth factor</i> , traduzido como Fator de crescimento fibroblástico |
| g | Gramas |
| GaAsAl | Arseneto de gálio-alumínio |
| HE | Hematoxilina e Eosina |
| ICS | Instituto de Ciências da Saúde |
| IL-1 β | Interleucina 1 β |
| ISOO | Do inglês <i>International Society of Oral Oncology</i> , traduzido como Sociedade Internacional de Oncologia Oral |
| J | Joule |
| J/cm ² | Joules por centímetro quadrado |
| kg | Quilograma |
| LBO | Laboratório de Bioquímica Oral (ICS/ UFBA) |
| LED | Do inglês <i>light-emitting diode</i> , traduzido como Diodo emissor de luz |
| LHE | Laboratório de Histologia e Embriologia |
| LCE | Largura da crista epitelial |
| MASCC | Do inglês <i>Multinational Association Supportive Care in Cancer</i> , traduzido como Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer |
| MEC | Matriz extracelular |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MMP | Metaloproteinase da matriz |
| MO | Mucosite oral |
| mg/kg | Miligrama por quilo |
| mW | Miliwatt |
| Nd:YAG | Neodímio: ítrio-alumínio-granada |
| nm | Nanômetro |

| | |
|--------------------|---|
| OE | Óleo essencial |
| PDGF | Do inglês <i>Platelet Derived Growth Factor</i> , traduzido como Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PVC | Policloreto de vinilia |
| TFBML | Terapia da fotobiomodulação laser |
| TGF- β | Do inglês <i>Transforming growth factor</i> , traduzido como Fator de crescimento transformador beta |
| TIMP | Do inglês <i>Tissue inhibitor of metalloproteinase</i> , traduzido como Inibidor tecidual da metaloproteinase |
| TNF- α | Do inglês <i>Tumor necrosis factor</i> , traduzido como Fator de necrose tumoral alfa |
| UEFS | Universidade Estadual de Feira de Santana |
| UFBA | Universidade Federal da Bahia |
| UP | Úlcera de pressão |
| VEGF | Do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como Fator de crescimento endotelial vascular |
| μm | Micrômetro |
| μm^2 | Micrômetro quadrado |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----------|---|
| > | Sinal de maior que |
| < | Sinal de menor que |
| = | Sinal de igualdade |
| p | Valor de p, que define como a probabilidade de se observar um valor da estatística de teste maior ou igual ao valor observado sob a hipótese nula |
| % | Sinal de percentual |
| n | Frequência ou número amostral de uma população |
| λ | Lambda, que representa comprimento de onda |
| + | Sinal de mais |
| \pm | Sinal de mais ou menos |
| ® | Marca registrada |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO GERAL | 19 |
| 1.1 | JUSTIFICATIVA | 21 |
| 1.2 | OBJETIVOS | 23 |
| 1.2.1 | Objetivo geral | 23 |
| 1.2.2 | Objetivos específicos | 23 |
| 1.2.2.1 | <i>Experimento em mucosa oral normal</i> | 23 |
| 1.2.2.2 | <i>Experimento com úlcera em dorso lingual</i> | 23 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 24 |
| 2.1 | O REPARO TECIDUAL | 24 |
| 2.2 | CAMOMILA (<i>M. RECUTITA</i>) | 26 |
| 2.2.1 | Planta medicinal | 26 |
| 2.2.2 | Ação no reparo tecidual | 29 |
| 2.3 | FOTOBIMODULAÇÃO LASER | 31 |
| 2.3.1 | Fotobiomodulação | 31 |
| 2.3.2 | Ação da TFBML no reparo tecidual | 32 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 | TRABALHO EXPERIMENTAL COM MODELO ANIMAL | 35 |
| 3.2 | GRUPOS EXPERIMENTAIS | 35 |
| 3.3 | PROCEDIMENTO CIRÚRGICO | 37 |
| 3.4 | MORTE E DESCARTE DOS ANIMAIS | 38 |
| 3.5 | PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO | 38 |
| 3.6 | ANÁLISES | 38 |
| 3.6.1 | Análise clínica | 38 |
| 3.6.2 | Análise histomorfométrica | 39 |
| 3.6.3 | Análise de dados | 40 |
| 4 | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | ARTIGO 1 – AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA ORAL NORMAL DE RATOS SUBMETIDA À APLICAÇÃO TÓPICA DE CAMOMILA (<i>Matricaria recutita</i>) | 41 |

| | | |
|--------------|--|----|
| 4.1.1 | Introdução | 42 |
| 4.1.2 | Materiais e Métodos | 43 |
| 4.1.2.1 | <i>Grupos experimentais</i> | 44 |
| 4.1.2.2 | <i>Infusão do chá de camomila</i> | 44 |
| 4.1.2.3 | <i>Morte dos animais</i> | 45 |
| 4.1.2.4 | <i>Análise clínica</i> | 45 |
| 4.1.2.5 | <i>Processamento histológico</i> | 46 |
| 4.1.2.6 | <i>Análise morfológica e morfométrica</i> | 46 |
| 4.1.2.7 | <i>Análise estatística</i> | 47 |
| 4.1.3 | Resultados | 48 |
| 4.1.4 | Discussão | 54 |
| 4.1.5 | Conclusão | 61 |
| 4.2 | ARTIGO 2 - AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA <i>MATRICARIA RECUTITA</i> ISOLADA OU EM ASSOCIAÇÃO À TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS | 62 |
| 4.2.1 | Introdução | 64 |
| 4.2.2 | Materiais e Métodos | 65 |
| 4.2.2.1 | <i>Trabalho Experimental com Modelo Animal</i> | 65 |
| 4.2.2.2 | <i>Procedimento cirúrgico</i> | 65 |
| 4.2.2.3 | <i>Grupos experimentais</i> | 65 |
| 4.2.2.4 | <i>Avaliação clínica</i> | 67 |
| 4.2.2.5 | <i>Morte dos animais</i> | 68 |
| 4.2.2.6 | <i>Processamento histológico</i> | 68 |
| 4.2.2.7 | <i>Avaliação morfológica e morfométrica</i> | 68 |
| 4.2.2.8 | <i>Análise estatística</i> | 69 |
| 4.2.3 | Resultados | 70 |
| 4.2.3.1 | <i>Análise clínica</i> | 70 |
| 4.2.3.2 | <i>Análise histomorfológica</i> | 72 |
| 4.2.3.3 | <i>Análise histomorfométrica</i> | 80 |
| 4.2.4 | Discussão | 83 |
| 4.2.5 | Conclusão | 93 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 5 | DISCUSSÃO GERAL | 94 |
| 6 | CONCLUSÃO GERAL | 97 |
| 6.1 | EXPERIMENTO EM MUCOSA NORMAL | 97 |
| 6.2 | EXPERIMENTO COM ÚLCERA EM DORSO LINGUAL | 97 |
| | REFERÊNCIAS | 99 |
| | APÊNDICES | 110 |
| | APÊNDICE A – Revisão narrativa da literatura | 111 |
| | APÊNDICE B - Ficha de análise morfométrica aplicada para coleta de dados do Artigo 1 | 126 |
| | APÊNDICE C - Ficha da análise morfométrica do colágeno aplicada para coleta de dados do Artigo 1 | 127 |
| | APÊNDICE D - Ficha da análise morfológica aplicada para coleta de dados do Artigo 1 | 128 |
| | APÊNDICE E - Ficha da análise morfológica das secções em HE aplicada para coleta de dados do Artigo 2 | 129 |
| | APÊNDICE F - Ficha da análise morfométrica das secções em HE aplicada para coleta de dados do Artigo 2 | 130 |
| | APÊNDICE G - Ficha da análise morfológica das secções coradas comm Sírius Vermelho aplicada para coleta de dados do Artigo 2 | 131 |
| | APÊNDICE H - Ficha da análise morfométrica das secções coradas com Sírius Vermelho aplicada para coleta de dados do Artigo 2 | 132 |
| | ANEXOS | 133 |
| | ANEXO A - Carta de Anuência do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). | 134 |
| | ANEXO B - Carta de Anuência do Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). | 135 |
| | ANEXO C - Parecer do CEUA do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA). | 136 |
| | ANEXO D - Comprovante de submissão do Artigo 1 para apreciação pelos revisores. | 137 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

O reparo tecidual representa um processo biológico complexo que se inicia no momento do trauma ou da enfermidade. Frente à agressão, é através do reparo que o organismo procura recuperar e restaurar o seu equilíbrio¹. Entretanto, milhões de pessoas no mundo permanecem com feridas estagnadas em alguma fase do reparo, em especial na fase inflamatória², o que desafia profissionais a encontrar agentes terapêuticos que promovam a cicatrização dessas feridas crônicas.

Há tempos, a comunidade científica busca compreender melhor os eventos bioquímicos e celulares que envolvem a cicatrização de ferimentos, o que inclui investigar e explanar os possíveis agentes capazes de modificar a resposta tecidual. Dentre os diferentes protocolos terapêuticos anteriormente testados, especialmente na Odontologia, encontram-se diversos moduladores do processo inflamatório³, como uso de analgésicos, anti-inflamatórios, agentes naturais, como a *Matricaria recutita* (*M. recutita*) e fotobiomoduladores, como o laser de baixa intensidade.

A *M. recutita*, conhecida popularmente como camomila, é uma espécie vegetal pertencente à lista de Produtos Tradicionais Fitoterápicos de Registro Simplificado, publicada pela Instrução Normativa 02/2014⁴. As propriedades que conferem a aplicabilidade de uso medicinal desta planta, estão relacionadas à sua composição, com mais de 120 constituintes bioativos, sendo alguns destes, os sesquiterpenos, flavonoides e as cumarinas^{5,6}. Tais constituintes são responsáveis por promover efeitos bioativos que envolvem ação antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória⁷.

Em uma revisão da literatura sobre o uso de agentes naturais, Pazyar et al.⁸ citam a indicação da *M. recutita* no manejo de ferimentos cutâneos, por acelerar a re-epitelização das feridas, ação também descrita por outros autores⁹⁻¹¹. Os benefícios da camomila na cavidade oral no controle dos microrganismos presentes no biofilme dental¹², nas gengivite¹³, infecções orais¹⁴ e no manejo de condições como a xerostomia¹⁵, mucosite oral (MO)¹⁶, e ulcerações aftosas recorrentes¹⁰ também foram relatados.

O extrato fluido da camomila comercialmente conhecido como Ad-muc® (Biolab, São Paulo, Brasil) possui reconhecidas propriedades antissépticas e anti-inflamatórias e indicação clínica para o tratamento da gengiva e mucosas de revestimento oral, conforme orientação do fabricante. Todavia, apesar de sua ampla

indicação clínica, não constam na bula do produto informações referentes à toxicidade e segurança do uso deste agente terapêutico¹⁷.

Uma busca atual da literatura não revelou trabalhos que relatassem o efeito do uso tópico da camomila em diferentes formulações sobre os tecidos de revestimento oral normais, o que instigou esta investigação sobre o tema em um modelo experimental. Em uma tentativa inicial de preencher esta lacuna observada na literatura vigente, apresenta-se o primeiro artigo original desta tese, intitulado “**Avaliação histomorfométrica da mucosa oral normal de ratos submetida à aplicação tópica de camomila (*Matricaria recutita*)**”.

Já a fotobiomodulação, descreve-se como um fenômeno capaz de modular inúmeros processos biológicos através de uma fonte de luz não ionizante¹⁸, sendo a fototerapia com o uso do laser de baixa potência ou de baixa intensidade, uma das ferramentas mais estudadas na prática clínica dos profissionais de saúde¹⁹. O laser é capaz de aumentar o metabolismo celular e induzir analgesia, possui ação anti-inflamatória e atua sobre o reparo tecidual²⁰. Contudo, tais efeitos são dependentes de parâmetros de irradiação e do tipo celular em questão³. Os benefícios do uso do laser de baixa potência com a terapia da fotobiomodulação laser (TFBML) no reparo tecidual já são bem descritos na literatura²¹⁻²³. Estudos clínicos e em modelos experimentais mostram que esta terapia também é capaz de acelerar o processo de cicatrização tecidual^{3,24,25}.

Em uma busca na literatura vigente, acerca do uso da associação da camomila com a TFBML durante o reparo tecidual, não foram encontradas publicações sobre a combinação de agentes, o que motivou a realização do segundo trabalho experimental aqui apresentado, intitulado “**Avaliação da aplicação da *Matricaria recutita* associada à terapia da fotobiomodulação laser na cicatrização da mucosa oral de ratos**”.

1.1 JUSTIFICATIVA

As doenças da mucosa oral representam várias condições comuns que afetam todos os segmentos da população em geral. Essas afecções podem ser categorizadas com base em seus achados clínicos, como condições agudas ou crônicas, lesões únicas ou múltiplas, de natureza primária ou recorrente²⁶.

Úlceras são caracterizadas pela perda do epitélio e consequente exposição do tecido conjuntivo⁴³ e são sinais comumente apresentados de um amplo espectro de doenças da cavidade oral. Diversas são as lesões ulceradas que podem envolver os tecidos de revestimento da cavidade oral. Estas podem ser advindas de fatores etiológicos distintos, como processos infecciosos, podem estar atreladas ao sistema imunológico, ou possuir origem traumática e ainda neoplásica²⁷.

Condições orais de etiologia infecciosa podem envolver a sífilis e a tuberculose. E as de origem não infecciosas, compreendem às estomatites aftosas recorrentes, eritema multiforme, lesões liquenoides, o líquen plano oral, lesões versículo-bolhosas como o pênfigo vulgar e o penfigoide cicatricial^{26,27}, ulcerações de origem traumática, seja a origem térmica, química ou mecânica e ainda de origem neoplásica²⁷, entre outras.

O uso tópico da camomila²⁸⁻³⁰, assim como da TFBML³¹⁻³³, é alvo constantes de investigações clínicas para averiguar a capacidade e os mecanismos de ação destes agentes no reparo tecidual. Ambas as terapêuticas vêm sendo indicadas para o manejo de diversas afecções orais, a exemplo da gengivite¹³ e ulcerações aftosas recorrentes¹⁰. Dentre estas alterações, inclui-se a MO, uma das principais e mais frequente complicação bucal decorrente do tratamento antineoplásico em região de cabeça e pescoço³⁴⁻³⁶, o que classifica esses casos como de maior morbidade³⁷.

Uma vez que tanto a TFBML quanto a *M. recutita* são moduladores do processo inflamatório, consequentemente, capazes de promover a aceleração do reparo tecidual^{23,38-42} quando utilizadas de maneira isolada, pode-se inferir que tais agentes sejam considerados aliados dos pacientes sob terapêuticas antineoplásicas. Esta possibilidade é fundamentada pela orientação, do uso de cada uma dessas terapêuticas, que consta nas diretrizes da prática clínica para pacientes com MO recomendadas pela Associação Multinacional de Cuidados de Suporte em Câncer e Sociedade Internacional de Oncologia Oral (MASCC/ ISOO)³¹.

Úlceras orais, independentemente de sua etiologia, geralmente são lesões dolorosas que estão relacionadas a várias condições que podem se desenvolver na cavidade oral e que podem acarretar o comprometimento da qualidade de vida do indivíduo. Apesar da ampla busca pela comunidade científica em testar e desenvolver terapêuticas para auxiliar no processo de reparo dessas lesões, não foram observados trabalhos sobre a associação da camomila tópica com a TFBML.

Este trabalho se justifica para melhor compreender tais agentes moduladores e verificar se há real benefício do uso destes de forma conjunta no reparo tecidual, para ajudar a responder estes questionamentos e servir como base para futuros estudos clínicos com o uso destes agentes, associados ou não.

Ainda, verificar o efeito da ação tópica da *M. recutita* na mucosa oral normal, visto que o uso desta planta vem sendo amplamente investigado^{9,43,44} e possui indicação de uso clínico no tratamento de úlceras orais, contudo sem informações referentes à segurança do uso desta¹⁷.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Verificar o padrão tecidual da mucosa oral normal bem como o processo de reparo em mucosa oral de ratos após o uso tópico da camomila isolada e em associação com a TFBML.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 *Experimento em mucosa oral normal*

- Examinar clinicamente a mucosa oral normal sob efeito do uso tópico da camomila;
- Avaliar histologicamente a morfologia tecidual da mucosa oral normal após a aplicação da camomila;
- Avaliar histomorfometricamente os parâmetros teciduais da mucosa oral normal, sob aplicação tópica de diferentes formulações de camomila.

1.2.2.2 *Experimento com úlcera em dorso lingual*

- Comparar clinicamente o tempo de re-epitelização das feridas cirúrgicas, entre os grupos experimentais;
- Avaliar comparativamente e de forma semiquantitativa os parâmetros histológicos do reparo tecidual, a saber celularidade tecidual, edema, infiltrado inflamatório e re-epitelização, com o uso de ambas as modalidades terapêuticas;
- Verificar histomorfometricamente o grau de re-epitelização da ferida cirúrgica com o uso da associação da infusão de camomila com a TFBML e da camomila em diferentes apresentações através de histomorfometria;
- Verificar se há diferença quantitativa e no padrão de organização de colágeno na ferida cirúrgica, com o uso da camomila isoladamente e na associação com laser;
- Determinar se há diferenças nos padrões clínicos, histológicos e histomorfométricos entre os grupos experimentais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O REPARO TECIDUAL

Após o dano tecidual, uma série de alterações dinâmicas que envolvem mediadores, células sanguíneas, matriz extracelular e proliferação celular parenquimatosa são desencadeadas a fim de restabelecer a integridade do tecido. Este fenômeno é denominado de reparo tecidual e é modulado pela atividade de células da resposta inflamatória, de queratinócitos, citocinas, componentes da matriz extracelular (MEC) e fatores de crescimento que irão orquestrar a migração, proliferação e diferenciação celular que ocorrerão no local da agressão^{40,46}.

O reparo inicia-se ainda na fase inflamatória aguda, que normalmente se estabelece nas primeiras 24 horas e pode se estender até 48 horas, em que é deflagrada uma resposta vascular capaz de promover a agregação plaquetária e formação de rede de fibrina, que objetiva além de reestabelecer a homeostasia, organizar uma matriz provisória, necessária para a migração celular, que permitirá os eventos que ocorrerão na fase seguinte, de proliferação celular, responsável pelo fechamento da ferida e que envolve fenômenos como a angiogênese, fibroplasia e re-epitelização⁴⁵.

Passadas 48 horas após o estabelecimento da lesão inicial, se intensifica a migração de monócitos que se diferenciam em macrófagos, capazes de liberar fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF), transformador (TGF), fibroblástico (FGF) e endotelial vascular (VEGF), estes se destacam como os principais estimuladores da formação do tecido de granulação²³.

O tecido de granulação é formado na etapa final da fase proliferativa e é composto caracteristicamente pela presença de fibroblastos, fluido seroso e novos pequenos vasos sanguíneos, colágeno, sendo este o principal componente, capaz de fortalecer e sustentar o tecido extracelular⁴⁷. Assim, a fase proliferativa se caracteriza pela substituição de estruturas especializadas com a diferenciação de tipos celulares precursores, existentes e recém-chegados no microambiente da lesão onde ocorre também estímulo para a proliferação fibroblástica, desde as primeiras 48 horas, até o 14º dia após o estabelecimento do dano tecidual⁴⁵.

A última fase do processo cicatricial é a de remodelamento, que se inicia duas a três semanas após a lesão podendo perdurar por mais de um ano e visa aumentar a força

tênsil do leito, através da reorganização da MEC com a maturação dos elementos na matriz e resolução da inflamação inicial. Nessa etapa, ocorre a degradação de componentes da matriz, como ácido hialurônico, fibronectina e res-síntese de fibras colagênicas, que se tornam mais espessas e com tendência a se orientar em paralelismo, o que confere maior resistência ao tecido neoformado⁴⁵.

Apesar de seguirem processo de cicatrização macroscópico semelhante, foi demonstrado que tecidos cutâneos e orais exibem variações no nível celular e molecular em relação aos processos celulares subjacentes à restauração da arquitetura e função tecidual⁴⁸. Ferimentos na mucosa de revestimento oral possuem uma cicatrização significativamente mais rápida, com formação mínima de cicatriz em comparação com feridas cutâneas. De forma concomitante, uma resposta inflamatória reduzida tem sido atribuída principalmente ao recrutamento reduzido de neutrófilos, macrófagos e células T, apesar de outros fatores contribuintes terem sido propostos para desempenhar papel na velocidade de cicatrização do tecido da cavidade oral, incluindo a presença de saliva, leucócitos, fatores de crescimento e diferenças fenotípicas entre fibroblastos orais e cutâneos, bem como a presença de bactérias, que estimulam a cicatrização de feridas⁴⁹.

Segundo Mah et al.⁵⁰, fibroblastos gengivais proliferam mais rapidamente e expressam níveis mais elevados de moléculas envolvidas na modulação da inflamação e remodelação da MEC através das metaloproteinases: MMP-1, -3, -10, e dos inibidores teciduais das MMP (TIMP-4) em comparação com os fibroblastos dérmicos.

Segundo Duarte, Quirino, Patrocínio, Anbinder⁴⁴, existe uma importante variável que está relacionada com as características do que se espera encontrar ao se avaliar secções teciduais durante o reparo tecidual em mucosa oral em modelo animal: o tempo. Desse modo no 3º dia do processo de reparo, há expectativa de observar no tecido conjuntivo, inflamação aguda e elevado número de infiltrado polimorfonuclear em meio a áreas de edema, com presença de poucos fibroblastos dispersos na matriz extracelular, acompanhados de vasos sanguíneos recém-formados. Um fino revestimento epitelial estratificado pavimentoso ortoqueratinizado com a proliferação iniciada a partir da borda da ferida também é esperado.

Com 7 dias, a úlcera encontra-se coberta por fina camada de epitélio estratificado pavimentoso ortoqueratinizado. A presença de edema não é prevista, e a intensa inflamação aguda deve ter sido substituída por um tecido com número moderado de células monomorfonucleares. No 10º dia, a presença de células

inflamatórias por vezes pode ser observada, o contingente de fibroblastos deve estar mais abundante permeado por fibras delicadas de colágeno⁴⁴.

Na fase de remodelamento ocorre a degradação do colágeno tipo III, que será realizado pela MMP produzida pelas células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e os macrófagos, enquanto a síntese do colágeno tipo I aumenta. Esta regulação é controlada por diversos fatores de crescimento como o TGF β 1 e o FGF, que exercem fortes efeitos na expressão gênica desta proteína⁴⁵. Esta etapa é associada à apoptose de miofibroblastos, células endoteliais e macrófagos, o que resulta em um remanescente tecidual no microambiente em reparo, composto principalmente de proteínas da MEC⁵¹.

2.2 CAMOMILA (*M. RECUTITA*)

2.2.1 Planta medicinal

A história evidencia que o uso de plantas medicinais faz parte da evolução humana sendo estes os primeiros recursos terapêuticos utilizados pelos povos antigos⁵². A primeira referência escrita sobre o uso de plantas como remédios foi descrita na obra chinesa intitulada “A Grande Fitoterapia”, de Shen Nung, que remonta a 2800 antes de Cristo (a.C)⁵³.

O valor terapêutico e tóxico das plantas já era conhecido na Grécia antiga, onde Hipócrates (460-377 a.C.), nomeado o “Pai da Medicina”, reuniu em sua obra “*Corpus Hipocraticum*” a súpula dos conhecimentos médicos de seu tempo, acerca das enfermidades, terapêuticas e dos remédios vegetais indicados. Entretanto, apenas no século XIX a fitoterapia teve seu maior avanço, em consequência do progresso científico na área da química, o que permitiu a análise, identificação e separação dos princípios ativos das plantas medicinais⁵⁴.

A Organização Mundial de Saúde (OMS)⁵⁵ verificou que práticas não convencionais de saúde, como a acupuntura, as técnicas manuais e a fitoterapia vêm ganhando espaço de modo complementar às terapias medicamentosas alopáticas. No Brasil o crescimento das práticas de medicina integrativa, dentre elas a fitoterapia, ocorreu apenas a partir da segunda metade dos anos 70 e década de 80⁵⁶.

Em geral, confunde-se fitoterapia com o uso de plantas medicinais. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é considerado medicamento fitoterápico, apenas aquele obtido exclusivamente de matérias-primas de origem

vegetal, com qualidade reprodutível e constante, cujos riscos e cuja eficácia sejam caracterizados por levantamentos etnofarmacológicos, documentações técnico científicas em publicações ou ensaios clínicos⁵⁷. Já a definição de planta medicinal, envolve a capacidade da mesma em ter efeito para uso médico ou terapêutico⁵⁸.

Entretanto, antes de serem utilizadas pela população faz-se necessário que as referidas plantas, passem por processos que gerem formulações com indicações de uso seguro e adequado. Tais processos englobam a química orgânica; fitoquímica, na qual ocorre o isolamento, purificação e caracterização de princípio ativo; a farmacologia, que investiga os extratos e os constituintes químicos isolados; a química orgânica sintética, que faz as transformações químicas de princípios ativos; a química medicinal e farmacológica que estuda a relação estrutura/atividade e os mecanismos de ação dos princípios ativos; e por fim, a preparação de formulações para a produção do fitoterápico⁵⁹⁻⁶².

Plantas classificadas como medicinais não precisaram passar pelos testes clínicos exigidos para os fármacos sintéticos, e credenciaram-se pelo seu uso tradicional ao longo de séculos⁵⁹. Tais plantas beneficiaram, e continuam a beneficiar, a humanidade, uma vez que nos tempos atuais, mais de 80% da população nos países em desenvolvimento depende do uso de terapias à base de vegetais⁶⁰. O uso de plantas medicinais corrobora com as proposições da OMS, que tem incentivado a valorização das terapias alternativas propostas pela medicina integrativa, sendo estas reconhecidas como recurso terapêutico especialmente úteis nos programas de atenção primária à saúde⁶¹.

A fitomedicina tem sido amplamente estudada em doenças crônicas como distúrbios cutâneos. Atividades anti-inflamatórias, antioxidante e antimicrobiana das plantas medicinais contribuem para o processo de cura tecidual. Eles estimulam a produção de citocinas críticas, como a interleucina-1 β (IL- 1 β) e outros fatores, como TGF- β , PDGF, FGF e VEGF, para acelerar a re-epitelização, angiogênese, formação de tecido de granulação, proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno nas feridas⁸.

Na medicina integrativa, inúmeros compostos apresentam capacidade de modular o processo inflamatório e as etapas do reparo tecidual. Dentre eles, destaca-se a camomila, também conhecida como *Matricaria Chamomilla L.*, *Chamomilla recutita (L.) Rauschert*, *Matricaria recutita L.* e *Matricaria suaveolens L.*, pertencente à família *Asteraceae*, representa um dos chás mais utilizados em todo o mundo. É uma planta medicinal natural amplamente conhecida, de fácil acesso pela população em geral, cujas

flores apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, antiespasmódicas e sedativas⁶³. Seus principais componentes incluem inúmeros compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, cumarinas e poliacetilenos⁶⁴.

Várias são as formas de preparação da camomila. A utilização do seu princípio ativo pode ser empregada através do uso direto da planta na forma de preparações caseiras, como infusões, chás, tinturas e pós, ou na forma de compostos puros isolados⁶⁵. O pó seco da flor é recomendado e utilizado para diversos tipos de problemas de saúde, variando de infecções e ferimentos nos tecidos de revestimento, distúrbios gastrointestinais até problemas do sono. Ingredientes medicinais são tradicionalmente extraídos das flores secas, utilizando para isto água, etanol ou metanol como solventes, e os extratos correspondentes são conhecidos respectivamente como extratos aquosos ou alcoólicos, como etanólicos e/ou metanólicos⁶⁶. A mistura de uma parte de flor de camomila em quatro partes de água com 12% de álcool de cereais é utilizada para o preparo da tintura de camomila⁶⁶, já o uso da planta inteira serve para formular cervejas e loção da erva medicinal para aplicação tópica⁶⁷.

Extratos aquosos, como na forma de chás obtidos através de infusões, contêm entre 10-15% do óleo essencial disponível na flor⁵. O óleo de camomila é um ingrediente popular na aromaterapia e para cuidados com os cabelos. O óleo essencial extraído da flor varia sua concentração entre 0,42 a 2%⁶⁸. O infuso de camomila (chá) é a apresentação terapêutica mais comum e é usada como agente para lavagem ou gargarejo a fim de tratar inflamações das membranas mucosas da boca e garganta⁶⁹.

A aplicação tópica de camomila através de uma forma de bochecho, entretanto, é contraditória na literatura⁷. Possíveis razões para explicar os distintos resultados obtidos, envolve características da composição, o tipo de camomila, a forma como a planta foi manipulada ou processada e até mesmo a forma de aplicação do agente em cada estudo^{41,44,70,71}. Ademais, a eficácia clínica do uso tópico depende de fatores inerentes à medicação como a estrutura química, a concentração, o veículo utilizado e a presença de outras substâncias, outros fatores como o número e a forma de aplicação, frequência e duração do uso bem como a localização da aplicação e a lesão envolvida também podem influenciar na ação terapêutica^{7,41}.

2.2.2 Ação no reparo tecidual

Em prol de sua sobrevivência, as plantas desenvolvem suas próprias defesas químicas, o que torna sua constituição complexa e capaz de atuar nos alvos específicos moleculares de seus predadores. Seus metabólitos secundários são produzidos para modular seu próprio metabolismo, porém, como consequência, alcançam alvos terapêuticos também em humanos⁵⁹. Uma revisão narrativa sobre os principais constituintes bioativos da *M. recutita*, bem como suas propriedades encontra-se disponível no apêndice A, ao final deste texto.

Enquanto a maior parte dos medicamentos sintetizados apresenta um único princípio ativo, responsável pelo efeito farmacológico desejado, extratos vegetais são constituídos por misturas multicomponentes de substâncias, que por vezes são capazes de atuar em alvos farmacológicos diferentes⁵⁹.

Os efeitos benéficos da camomila no reparo tecidual podem ser devido às suas atividades estrogênicas, antioxidantes e imunomoduladoras⁷² que podem afetar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal/gonadal, potencializando a agregação plaquetária e dessa forma interferindo positivamente na cicatrização de feridas⁷³ ou ainda, através de mecanismos desconhecidos⁷².

Em um estudo experimental em ratos, Nayak, Raju, Rao⁷² realizaram um ferimento cutâneo no dorso dos animais tratados com o extrato de *M. recutita* (camomila) em uma dose de 120mg/kg diariamente por via oral durante 14 dias (grupo teste), e um grupo controle. Os autores observaram uma taxa de re-epitelização mais rápida no grupo teste (15,20 dias \pm 0,13) do que nos animais do grupo controle (18,0 dias \pm 0,10). A redução na área da ferida no grupo teste (61%) foi estatisticamente significativa ($p < 0,002$) quando comparada com o grupo controle (48%).

Outro estudo experimental conduzido por Jarrahi et al.⁷⁴, utilizou 30 ratos submetidos a uma incisão linear de 3 cm em dorso cutâneo, alocados em três grupos experimentais. O grupo controle não recebeu tratamento; o grupo azeite recebeu aplicação tópica de azeite uma vez por dia, desde o início do experimento até a cicatrização da ferida; e o grupo tratado com camomila dissolvida em azeite ao mesmo tempo. Os autores não encontraram diferença significativa da taxa de cicatrização entre os grupos controle e azeite. A porcentagem da medição da ferida nos dias 5, 8 e 11 mostrou um incremento ($p < 0,05$) no grupo que utilizou a camomila dissolvida em azeite

em comparação ao controle. Dessa forma, segundo os autores, o extrato de camomila foi capaz de acelerar o processo cicatricial neste experimento.

De igual modo, em 2011, Duarte, Quirino, Patrocínio, Anbinder⁴⁴ conduziram outro estudo experimental, realizando úlceras em dorso de língua de ratos com *punch* de 5 mm. Os pesquisadores alocaram os animais em um grupo controle e um grupo teste, no qual foi aplicado na ferida extrato fluido de camomila (Ad-muc, Biolab, Taboão da Serra, SP, Brazil) de 12 em 12 horas, conforme orientação do fabricante. Após análise histomorfológica das secções obtidas e análise clínica quantitativa da área de re-epitelização, segundo os autores, os efeitos mais significativos observados durante a análise histomorfológica foram relacionados ao período experimental em si e não ao tratamento instituído. Contudo, notaram que os fibroblastos foram dispostos de forma mais desorganizada nas amostras do grupo controle em comparação ao grupo teste, cujos fibroblastos e fibras estavam paralelos à superfície. A diferenciação das papilas linguais também foi mais pronunciada nas amostras dos animais tratados.

Em uma revisão sistemática, Dantas et al.⁷⁵ objetivou avaliar o efeito do uso tópico da camomila na MO quimioinduzida com parâmetros clínicos e/ou histológicos em modelo animal. Para tal, após criteriosa avaliação dentre os artigos que envolviam estudos experimentais em animais, cuja abordagem terapêutica foi exclusivamente o uso de camomila tópica sob diferentes concentrações, sem associação com outros agentes, apenas dois trabalhos foram incluídos. Ambos utilizaram a mesma metodologia para induzir MO e a ferida em mucosa jugal dos animais. Da mesma forma, o início do uso da pomada com 100 mg de extrato fluido de camomila, comercialmente conhecida como Ad-Muc®, se iniciou no 5º dia, em ambos os estudos. Quanto ao resultado dos estudos selecionados, a aplicação tópica de camomila na MO induzida por quimioterapia em hamsters se mostrou eficaz, tanto do ponto de vista clínico quanto histológico. Concluiu-se que a camomila apresentou resultados clínicos e histopatológicos positivos e a capacidade de reduzir os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias.

Curra et al.⁷⁰, em um estudo experimental com hamsters, avaliaram o efeito do tratamento tópico com camomila e corticosteroides sobre o perfil de citocinas teciduais (IL-1 β e TNF- α) na MO quimioinduzida. A análise semiquantitativa deste trabalho revelou que a imunomarcção de IL-1 β e TNF- α no 10º dia, período de pico da MO, apresentou escores mais baixos para ambas citocinas pró-inflamatórias no grupo tratado com camomila. Segundo os autores, a redução nos níveis das citocinas estudadas

ocorreu concomitantemente com a melhora clínica e histopatológica da MO, o que permitiu aos autores inferir que o tratamento com camomila foi responsável pela diminuição da resposta inflamatória observada na mucosite induzida por 5-fluorouracil em hamsters.

Um dos principais flavonoides presentes na *M. recutita*, a apigenina, possui potencial anti-inflamatório devido a sua capacidade de interferir na adesão leucocitária e na regulação positiva da proteína de adesão em células endoteliais humanas, de inibir a síntese de prostaglandinas induzida pela IL-1, assim como a produção de IL-6 e IL-8 induzidas pelo TNF- α e bloquear a adesão de leucócitos a células endoteliais tratadas com citocinas^{6,76,77}.

Segundo Liang et al.⁷⁶, a apigenina possui ainda efeito inibitório na expressão de COX-2 e produção de óxido nítrico⁷⁶. Camazulenos também possuem ação inibitória na síntese de leucotrienos⁷⁸. As enzimas ciclooxigenase (COX) e 5-lipoxigenase estão envolvidas na liberação de ácido araquidônico, que conseqüentemente interfere na formação dos leucotrienos, os quais constituem um ponto de partida para uma resposta inflamatória⁷⁹.

2.3 FOTOBIMODULAÇÃO LASER

2.3.1 Fotobiomodulação

Desde o início do século XXI, inúmeros artigos publicados com ênfase nos efeitos fisiológicos da luz vermelha e infravermelha próxima demonstraram que esses comprimentos de onda de luz, são capazes de penetrar nos tecidos humanos e afetar localmente, e até mesmo sistemicamente, o metabolismo celular, a sinalização, processos inflamatórios e a produção de fatores de crescimento⁸⁰.

O fenômeno foi descrito pela primeira vez na literatura em 1967, por Endre Mester, na Hungria⁸¹, e se refere ao uso de fótons em uma irradiância não térmica, capaz de alterar a atividade biológica tecidual⁸². Apesar de ter sido conhecido por mais de 60 outros nomes na literatura, como “terapia com laser de baixa potência” ou “laserterapia”, o termo “terapia de fotobiomodulação” (TFBM) atualmente é o mais utilizado, uma vez que não implica no uso de um aparelho laser necessariamente, e sim no uso de outras fontes de luz, como os diodos emissores de luz incoerentes (LED), que podem funcionar igualmente bem. Além disso, o uso da terminologia “modulação”,

diferente de “fotobioativação” ou “bioestimulação”, não implica que os efeitos terapêuticos sejam sempre estimulatórios, visto que, em algumas circunstâncias eles são inibitórios^{65,67,68}.

Inventado em 1960 por Theodore Maiman, o primeiro aparelho de Laser, do acrônimo “amplificação de luz por emissão estimulada de radiação”, consiste em uma fonte de luz⁶⁵ de largura espectral estreita e envolve porções do espectro eletromagnético vermelho ou infravermelho próximo (390nm – 1600nm), que pode ser de onda contínua ou pulsada, com uma densidade de potência (irradiância) entre 1mw-5W/cm^{3,81,83,84}, que utiliza o fenômeno físico de emissão estimulada para criar um feixe de luz monocromático e coerente de baixa divergência⁸⁰.

Comprimentos de onda (λ) na faixa de 500 a 700 nm (vermelho) são considerados adequados para tratar lesões teciduais superficiais, enquanto comprimentos de onda que variam entre 800 e 1000 nm (infravermelho próximo) são mais indicados para lesões de tecidos mais profundos⁸⁵. Entende-se que essas faixas específicas de comprimento de onda podem ser utilizadas para promover o transporte de elétrons, e dessa forma promover aumento da produção de adenosina trifosfato (ATP), aumento da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA), modulação de espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies de oxigênio nítrico (EON) e a indução de fatores de transcrição^{80,86}. Dessa forma, ao contrário de outros procedimentos médicos a laser, a TFBML não consiste em um mecanismo térmico ou ablativo e sim em um efeito fotoquímico, no qual a luz é absorvida e promove uma mudança química, comparável ao fenômeno da fotossíntese nas plantas⁸¹.

O método terapêutico que utiliza a luz laser de baixa energia, ou baixa intensidade, é capaz de fornecer uma energia baixa, porém suficiente para produzir estimulação, sem a destruição do sistema alvo⁸¹. Pode-se então dizer que a TFBML utiliza lasers de baixa intensidade, ou de baixa potência, que compreendem radiações não invasivas e não ionizantes que, em contato com diferentes tecidos, promovem efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares¹⁸.

2.3.2 Ação da TFBML no reparo tecidual

Segundo a literatura, dentre os diversos benefícios promovidos por essa terapêutica sobre ferimentos cutâneos, encontram-se o estímulo à biossíntese de integrantes da matriz extracelular, como o colágeno, mitose de diversos tipos celulares,

incluindo fibroblastos e células epiteliais, bem como revascularização, com o estímulo à neoangiogênese^{40,87}, fenômenos necessários para a resolução do processo inflamatório e reparo tecidual com a contração da ferida e re-epitelização.

A TFBML, segundo Reis et al.⁴², é capaz de modular o reparo tecidual promovendo a redução do edema e acelerando a transição de característica do infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares para monomorfonucleares, capaz também de aumentar a síntese colagênica e melhorar o padrão de organização dos componentes fibrilares da matriz extracelular. De igual modo, Viegas et al.⁸⁸ confirmaram que essa modalidade terapêutica não reduz a resposta inflamatória, porém promove o início precoce e conseqüente resolução desta fase do reparo, além de ser capaz de aumentar a síntese de colágeno.

Wagner et al.³ investigaram através de um estudo experimental em mucosa oral de ratos *Wistar*, o impacto da TFBML na cicatrização de úlceras orais. Após realizar um ferimento com *punch* de 3mm no dorso da língua dos animais, os animais foram alocados randomicamente em três grupos experimentais: controle (0 J/cm²), Laser 4 J/cm² e Laser 20 J/cm². O laser foi aplicado imediatamente após o procedimento cirúrgico e uma vez ao dia durante 14 dias consecutivos e a eutanásia dos animais foi programada para os dias 1, 5, 10 e 14 após o procedimento cirúrgico. À análise clínica, os autores observaram diminuição na área média da ferida em todos os grupos no dia 5, com a menor área no grupo do laser 4 J/cm², e, no dia 10, todos os animais deste grupo apresentaram lesões totalmente reparadas, sendo que essa situação clínica só foi observada ao final do experimento nos outros grupos. Histologicamente, no dia 5, todos os animais do grupo laser 4 J/cm² exibiram re-epitelização completa, observada nos demais grupos a partir do dia 10. A presença de infiltrado mononuclear, neovascularização e proliferação de fibroblastos eram evidentes e as fibras de colágeno foram predominantemente organizadas e paralelas à camada basal do epitélio. Os autores³ concluíram que o laser vermelho ($\lambda 660$ nm) com potência de saída de 40 mW é capaz de acelerar o processo de cicatrização da mucosa oral. Além disso, re-epitelização e cicatrização tecidual mais rápida e organizada da mucosa oral foram alcançadas com uma densidade de energia de 4 J/cm² em comparação com 20 J/cm².

Em sua revisão sistemática publicada em 2017, Suter, Sjölund, Bornstein⁸⁹ investigaram os benefícios do uso do laser na cicatrização e na dor de pacientes sob tratamento de estomatites aftosas, através da análise de 11 artigos incluídos no seu trabalho. Dos artigos selecionados, 9 incluíram a avaliação do reparo e dentre estes, 5

autores observaram redução do tempo de cicatrização após a irradiação laser. Os autores demonstraram que a utilização de lasers (laser de CO₂, laser de Nd:YAG e laser de diodo) é uma opção para aliviar os sintomas e promover a cicatrização de feridas em pacientes com estomatite aftosa com baixo risco de efeitos colaterais.

Em uma meta-análise para elucidar o benefício clínico da TFBML na redução da dor e do edema e na redução da limitação de abertura de boca, He et al.⁹⁰ concluíram que esta terapêutica foi eficaz na redução destes três parâmetros. Achado similar encontrado por Oliveira et al.⁹¹, cujo protocolo terapêutico estabelecido com uso do laser de AsGaAl, com 4 J/cm² de densidade de energia, comprimento de onda 808 nm, por períodos de 30 a 40 segundos intra e extraoral, respectivamente, irradiado 24 e 48 horas após a cirurgia, também se mostrou eficaz na redução da dor no pós-operatório de pacientes submetidos à remoção cirúrgica de terceiros molares inferiores e ainda induziu os autores a considerar sua utilização como método auxiliar no restabelecimento da amplitude de abertura de boca dos indivíduos.

Em 2019, Zadik et al.⁹² objetivaram revisar sistematicamente as evidências sobre a TFBML para a MO radio/quimioinduzida e, conseqüentemente, atualizar as diretrizes de prática clínica do MASCC/ISOO para o manejo desta condição. Segundo os autores, os dados relatados na literatura apresentam benefícios para a prevenção de MO e sua dor associada em certos tipos de populações de câncer. O alívio da dor se correlacionou com a redução da gravidade da MO ao longo do tempo. A terapêutica pode ser considerada uma modalidade de tratamento válida especialmente em pacientes pediátricos que podem não ser capazes de cumprir outras modalidades, como o uso de bochechos. Os autores notaram, entretanto, variação nos parâmetros apresentados pelos diversos ensaios clínicos controlados randomizados (ECR). Dessa forma, ECR mais bem desenhados, incluindo populações de pacientes pediátricos e pacientes tratados com quimioterapia, são necessários para esclarecer o potencial promissor do uso da TFBML no manejo da MO em pacientes com câncer.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TRABALHO EXPERIMENTAL COM MODELO ANIMAL

Os procedimentos deste estudo foram conduzidos no Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) (ANEXO 1) e no Laboratório de Bioquímica Oral (LBO) do ICS/UFBA (ANEXO 2) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICS/ UFBA sob número 3562050618 (ANEXO 3).

Este trabalho gerou dois manuscritos de artigos originais, que estão em processo de avaliação após submissão na comunidade científica e que serão aqui apresentados como Artigo 1, intitulado “**Avaliação clínica e histomorfométrica da mucosa oral normal de ratos submetida à aplicação tópica de camomila (*Matricaria recutita*)**” e Artigo 2, intitulado “**Avaliação da aplicação da *Matricaria recutita* isolada ou em associação à terapia da fotobiomodulação laser na cicatrização da mucosa oral de ratos**”.

Foram utilizados ratos machos *Wistar*, *Rattus norvegicus albinus*, pesando em média 238g, que ficaram alojados em gaiolas plásticas específicas, em grupos de cinco animais, com boas condições de iluminação e temperatura ($\pm 26^{\circ}\text{C}$) submetidos a uma dieta comercial (Ração Nuvilab, Quimtia, Colombo-PR, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Passaram por adaptação no ambiente do biotério por um período de sete dias.

3.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para determinação do quantitativo de animais, foi utilizado como consulta o estudo de Martins et al.¹¹, que realizou estudo semelhante em relação ao uso da camomila em reparo tecidual, bem como o trabalho de Pavesi et al.⁴¹ Estes trabalhos auxiliaram na verificação de um n amostral, todavia, o cálculo amostral foi realizado determinando um total de 15 animais por grupo.

Os animais foram alocados aleatoriamente nos respectivos grupos experimentais, conforme descrito nas tabelas 1 e 2 e no texto abaixo, de acordo com o artigo correspondente originado.

Tabela 1 – Randomização dos animais nos grupos experimentais correspondentes ao Artigo 1 (LBO/UFBA, 2022).

| Grupos Experimentais | Períodos de Eutanásia | | |
|--------------------------------|-----------------------|----|-----|
| | D0 | D7 | D14 |
| <i>Baseline</i> (n=3) | 3 | - | - |
| Controle (n=2) | - | 1 | 1 |
| Camomila Extrato Fluido (n=10) | - | 5 | 5 |
| Camomila infusão 1 (n=10) | - | 5 | 5 |
| Camomila infusão 2 (n=10) | - | 5 | 5 |

¹D0: dia do início do experimento; D7: 7 dias após início de aplicação das terapêuticas procedimento cirúrgico; D14: 14 dias após início de aplicação das terapêuticas. Fonte: própria do autor.

Tabela 2 – Randomização dos animais nos grupos experimentais correspondentes ao Artigo 2 (LBO/UFBA, 2022).

| Grupos Experimentais | Períodos de Eutanásia | | |
|---------------------------------|-----------------------|----|-----|
| | D3 | D7 | D14 |
| Controle (n=15) | 5 | 5 | 5 |
| Camomila Extrato Fluido (n=15) | 5 | 5 | 5 |
| Camomila infusão 2 (n=15) | 5 | 5 | 5 |
| Laser (n=15) | 5 | 5 | 5 |
| Camomila infusão + Laser (n=15) | 5 | 5 | 5 |

¹D3: 3 dias após procedimento cirúrgico; D7: 7 dias após procedimento cirúrgico; D14: 14 dias após procedimento cirúrgico. Fonte: própria do autor.

Grupo *Baseline*: Animais selecionados como controle negativo, em que não foi empregada forma terapêutica (apenas presente no Artigo 1).

Grupo Controle: Animais submetidos à aplicação de soro fisiológico (0,9%) com uso de haste flexível plástica com algodões nas extremidades (Cotonetes, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil), em intervalos de 12 horas em mucosa jugal direita (Artigo 1) e em dorso de língua (Artigo 2). Adicionalmente foi realizada simulação de irradiação com aparelho de Laser diodo desligado.

Grupo Camomila Extrato Fluido: Animais submetidos à aplicação tópica de extrato fluido de camomila (Ad-Muc®, Biolab, São Paulo, Brasil), com uso de haste flexível plástica com algodões nas extremidades (Cotonetes, Johnson & Johnson, São

Paulo, Brasil), em intervalos de 12 em 12 horas, até o dia da eutanásia, como preconizado pelo fabricante do medicamento.

Grupo Infusão 1: Animais submetidos à aplicação tópica de infusão de camomila, preparadas conforme indicação do fabricante que recomenda uso de um sachê para uma xícara de água fervente, correspondente a 250 mL de água filtrada fervida em chaleira elétrica (Electrolux, Curitiba, Brasil). Após atingir a temperatura de ebulição (100 °C), a água, ainda com temperatura superior a 90°C⁹³, foi despejada em uma caneca, e o sachê de camomila (Chás Real®, Paraná, Brasil) foi colocado em infusão com a caneca tampada, durante 3 minutos, conforme orientação do fabricante. Após o preparo, o chá de camomila foi mantido resfriado a uma temperatura entre 20-22°C para uso ao longo de 24 horas, passado esse período, nova infusão de chá foi preparada. A aplicação na cavidade oral dos animais deu-se em temperatura resfriada com intervalos de aplicação de 12 horas, com o auxílio de um conta gotas, até o dia da eutanásia (apenas no Artigo 1).

Grupo Infusão 2: Animais seguiram o mesmo protocolo do Grupo Infusão 1, entretanto, a aplicação ocorreu três vezes ao dia (08 em 08 horas).

Grupo Laser: Animais irradiados com aparelho de laser diodo semiconductor (Laser DMC Therapy EC, São Paulo, Brasil) de AsGaAl em emissão contínua, com potência máxima de saída de 100mW, área da ponta ativa do aparelho de 0,028cm², comprimento de onda de 660nm, aplicado em dias alternados. A dosimetria utilizada foi de 35 J/cm², 1J de aplicação no centro da ferida, por 10 segundos, iniciado ainda no dia do procedimento cirúrgico (apenas no Artigo 2).

Grupo Camomila Infusão + Laser: Animais tratados com as terapêuticas da aplicação tópica três vezes ao dia da infusão de camomila e da TFBML, conforme descrito para os grupos isolados, iniciando-se pela irradiação laser prévia à aplicação da camomila (apenas no Artigo 2).

3.3 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Após pesagem, os animais correspondentes ao trabalho sobre reparo tecidual (Artigo 2) foram anestesiados com uma mistura de Ketamina® (Farex do Brasil Ltda. Porto Alegre-Brasil) e Xilazina® (J.A. Saúde Animal, São Paulo-Brasil) na proporção de 90mg/kg e 5mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal. Uma porção circular do

dorso da língua foi removida utilizando-se um bisturi circular de 5 mm de diâmetro (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha).

3.4 MORTE E DESCARTE DOS ANIMAIS

Os animais foram eutanasiados por administração de anestésico injetável de 90mg/kg de Ketamina® associado a 10mg/kg de Xilazina®, na mesma seringa, administrado por via intraperitoneal, de forma que a dose fosse suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal e confirmação da morte. Os períodos de morte estabelecidos foram descritos nas tabelas 1 e 2.

Após a morte dos animais, as carcaças foram acondicionadas em sacos de PVC em freezer a - 20°C com posterior incineração após coleta.

3.5 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os espécimes obtidos por autópsia foram fixados em formalina tamponada a 4%, com pH 7,4 e foram enviados para o processamento histológico de rotina no laboratório de Patologia Oral da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e no Laboratório de Histologia e Embriologia (LHE) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), onde seguiu-se o processamento histológico, até inclusão em blocos de parafina. Os fragmentos teciduais foram então cortados em micrótomo, para obtenção de secções histológicas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) com 5 µm de espessura

Para realização da análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas (colágeno total) do tecido conjuntivo, os fragmentos teciduais inclusos em blocos de parafina foram enviados ao LHE/FADBA, em Cachoeira-BA, para realização da coloração de Sírius Vermelho, específico para colágeno.

3.6 ANÁLISES

3.6.1 Análise clínica

As mucosas jugais foram inspecionadas visualmente durante todo o período do experimento, com o intuito de verificar possíveis alterações clínicas. Caso estas fossem

verificadas, seriam registradas para posterior avaliação. Características macroscópicas do processo de reparo das úlceras em dorso lingual foram analisadas diariamente com o auxílio de luz ambiente, espátulas de madeira e elásticos para auxílio na abertura de boca dos animais, que foram contidos por um dispositivo plástico atraumático, conforme modelo utilizado por Martins⁹⁴ e Pelisser, Vier-Pelisser, Fontanella, Figueiredo⁹⁵, causando mínimo estresse. Tal avaliação obteve a classificação "presente", quando ainda eram observados sinais clínicos da úlcera, e "ausente" quando o processo de reparo da úlcera havia sido visivelmente completado.

Nos dias da eutanásia, a inspeção visual foi com o auxílio de um paquímetro, que mediu o diâmetro da ferida, quando ainda presente.

3.6.2 Análise histomorfométricas

Os examinadores foram calibrados para uso dos programas e equipamentos no LBO/ICS/UFBA. Para as análises, que foram realizadas às cegas através do uso de máscaras nas lâminas, utilizaram-se o *Software Motic Images Plus 2.0* (Motic Asia, Hong Kong, China), *Software ImageJ* (*National Institutes of Health*, Bethesda, Md, EUA) e microscópio de luz Quimis BA410 (Quimis, São Paulo, Brasil) acoplado à câmera Moticam 5.0.

Com as secções coradas em HE, foi realizada uma análise morfológica no microscópio de luz, em triplicata, de cada secção histológica utilizando-se a objetiva de 10x. A caracterização ocorreu de forma semiquantitativa de acordo com as seguintes categorias: intensa (+++), moderada (++) , discreta (+) e ausente (0), conforme descrito por Medrado et al.²³. A partir das secções coradas com Sírius Vermelho, foi realizada a análise morfológica das fibras colágenas e do padrão de expressão colagênica tecidual, bem como análise quantitativa do percentual da área do colágeno. As análises ocorreram com intervalos de uma semana entre elas.

Para a análise morfométrica, utilizou-se o *Software Motic Images Plus 2.0*, e foi realizada a partir da captura de imagens de três áreas distintas de cada uma das secções teciduais, em objetiva de 10x, através do microscópio acoplado à câmera. As mensurações lineares realizadas utilizaram escala em micrômetros (μm) e foram realizadas tanto nas secções referentes às mucosas jugais quanto nas de úlcera em língua.

A análise quantitativa do percentual de colágeno total em relação à área total do tecido foi realizada pelo *Software ImageJ*, com a padronização da área de $720.000 \mu\text{m}^2$ da imagem, considerando a altura de $800 \mu\text{m}$ e o comprimento de $900 \mu\text{m}$, por dois examinadores cegos, previamente calibrados, realizada também a partir das capturas de três áreas distintas das secções teciduais na objetiva de 10x.

3.6.3 Análise de dados

Foi criado um banco de dados no *Microsoft Excel* 2016 (versão 2016), para análise descritiva com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada, incluindo-se análise quantitativa do percentual de colágeno. Os dados das variáveis morfológicas foram apresentados com frequências absolutas e relativas, também com moda, valores mínimo e máximo.

Para as variáveis morfométricas e porcentagem de área de colágeno em relação à área total do tecido, os dados foram expressos em média, desvio padrão, mediana e intervalo interquartil. Todas as análises foram realizadas no programa R (*Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria), com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1

AVALIAÇÃO CLÍNICA E HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA ORAL NORMAL DE RATOS SUBMETIDA À APLICAÇÃO TÓPICA DE CAMOMILA (*Matricaria recutita*)

Tila Fortuna¹, Hortência Resende dos Santos Della Cella², Juliana Borges Dantas¹, Fábio Menezes³, Tarsila de Carvalho Freitas Ramos⁴, Gabriela Botelho Martins⁵

1 Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS, UFBA).

2 Graduada de Odontologia. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA).

3 Laboratório de Histologia e Embriologia da Faculdade Adventista da Bahia (LHE, FADBA).

4 Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde na Universidade Federal da Bahia (UFBA). Professora Assistente da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

5 Doutora em Estomatologia Clínica pela PUCRS. Professora Associado do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS, UFBA).

Endereço de Correspondência:

Tila Fortuna

Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil.

Tel.: (+55) (71) 3283-8891

E-mail: tilafortuna@gmail.com

Resumo

Introdução: A *Matricaria recutita*, conhecida como camomila, é utilizada mundialmente como erva medicinal por apresentar ação nos transtornos digestivos, propriedades antimicrobiana, analgésica e anti-inflamatória. Na Odontologia, possui amplo uso no tratamento de inflamações e infecções orais de diversas etiologias. No entanto, sua ação sobre a mucosa oral normal ainda não foi documentada. **Objetivo:** Avaliar o padrão tecidual após a aplicação tópica de diferentes apresentações da camomila na mucosa oral normal de ratos. **Materiais e Métodos:** Trinta e cinco ratos machos tipo *Wistar* foram alocados randomicamente em 04 grupos experimentais: Controle/*baseline* (G1), Extrato fluido de camomila - 2x/dia (G2), Camomila Infusão 1 - 2x/dia (G3), Camomila Infusão 2 - 3x/dia (G4). A eutanásia dos animais ocorreu nos dias 7 e 14 após o começo das aplicações da planta medicinal na mucosa jugal direita.

Secções coradas com Hematoxilina e Eosina foram avaliadas por morfologia descritiva (degeneração da camada basal epitelial; presença de infiltrado inflamatório e expressão de colágeno) e morfometria (distância da camada basal à superfície epitelial; distância da crista epitelial para a superfície epitelial; largura da crista epitelial; distância inter-cristas; e espessura da camada córnea). O quantitativo e o padrão de organização do colágeno total foi avaliado pela coloração de Sírius Vermelho. **Resultados:** Nenhum dos grupos experimentais apresentou diferenças estatísticas significativas entre si, além de apresentarem semelhança ao G1. **Conclusão:** O uso tópico da camomila, independentemente da posologia ou formulação investigada, não provocou dano tecidual em mucosa oral normal de ratos, podendo ser considerada um agente terapêutico bem tolerado pelos tecidos.

Palavras-chave: Camomila. Fitoterapia. Mucosa Bucal. Histologia

Abstract

Introduction: *Matricaria recutita*, known as chamomile, is used worldwide as a medicinal herb for having action in digestive disorders, antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory properties. In Dentistry, it has wide use in the treatment of inflammation and oral infections of different etiologies. However, its action on the normal oral mucosa has not yet been documented. **Objective:** To evaluate the tissue pattern after topical application of different presentations of chamomile in the normal oral mucosa of rats. **Materials and Methods:** Thirty-five male *Wistar* rats were randomly allocated into 04 experimental groups: Control/baseline (G1), Chamomile fluid extract - 2x/day (G2), Chamomile Infusion 1 - 2x/day (G3), Chamomile Infusion 2 - 3x/day (G4). The euthanasia of the animals took place on days 7 and 14 after the beginning of applications of the medicinal plant in the direct jugal mucosa. Sections stained with Hematoxylin and Eosin were evaluated by descriptive morphology (degeneration of the epithelial basal layer; presence of inflammatory infiltrate and collagen expression) and morphometry (distance from the basal layer to the epithelial surface; distance from the epithelial crest to the epithelial surface; width of the crest epithelial thickness; inter-crest distance; and stratum corneum thickness). The quantity and organization pattern of total collagen was evaluated using Sirius Red staining. **Results:** None of the experimental groups showed significant statistical differences between them, in addition to being similar to G1. **Conclusion:** The topical use of chamomile, regardless of the dosage or formulation investigated, did not cause tissue damage in normal oral mucosa of rats, and can be considered a therapeutic agent well tolerated by tissues.

Keywords: Chamomile. Phytotherapy. Mouth Mucosa. Histology

4.1.1 Introdução

O Brasil possui uma farmacopéia popular diversificada em plantas medicinais, resultante da miscigenação cultural envolvendo africanos, europeus e indígenas, com

introdução de espécies exóticas pelos colonizadores e escravos⁹⁶. De acordo com a Organização Mundial da Saúde⁹⁷, a definição de planta medicinal é “*todo vegetal que contém, em um ou vários de seus órgãos, substâncias que podem ser empregadas para fins terapêuticos ou precursores de substâncias utilizadas para tais propósitos*”.

Dentre a diversidade das espécies vegetais e de biomas encontrados no Brasil, a planta *Matricaria recutita* (*M. recutita*), conhecida popularmente como camomila, é amplamente utilizada em todo o mundo, principalmente sob a forma de chás/infusão e decocção^{44,98-100}. Contém constituintes bioativos como flavonóides, matricina, camazuleno e terpenóides, que conferem a esta planta propriedades anti-inflamatória, antiespasmódica e antibacteriana^{66,101}. Dentre os possíveis usos medicinais da *M. recutita*, sabe-se que é indicada no controle das perturbações estomacais em geral, diarreia, náuseas, inflamações das vias urinárias e distúrbios menstruais, além de inflamações dos olhos e boca⁶⁵.

Alguns estudos experimentais demonstram a capacidade desta planta medicinal em aumentar a velocidade do reparo tecidual e dessa forma promover uma re-epitelização mais rápida de úlceras^{41,44,72}. Tal atividade explica a indicação do uso da camomila sobre feridas difíceis de cicatrizar e nas afecções da pele em geral⁶⁵.

Devido às ações antimicrobianas e bioestimuladoras no reparo tecidual, a camomila tem sido utilizada na Odontologia para controle dos microrganismos presentes no biofilme dental¹² e como adjuvante na terapia de condições como: xerostomia¹⁵, mucosite¹⁴, gengivite¹³, infecções orais¹⁴ e ulceração aftosa recorrente¹⁰.

Apesar de ser amplamente investigada ao longo dos anos, ainda não foi claramente descrito na literatura os achados histopatológicos da aplicação tópica desta planta medicinal sobre tecidos normais, tendo em vista que durante a aplicação, independente da finalidade, a substância acaba por atingir regiões de tecido consideradas sadias durante o seu período de uso. Desta forma, este trabalho se justifica pela contribuição do conhecimento acerca da repercussão do uso da camomila, sob diferentes formulações e concentrações, em mucosa oral normal em ratos. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o padrão tecidual após a aplicação tópica de diferentes apresentações da camomila (*M. recutita*) na mucosa oral normal de ratos.

4.1.2 Materiais e métodos

Os procedimentos foram conduzidos no Biotério do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia - ICS/ UFBA (nº 3562050618).

Trinta e cinco (35) ratos machos tipo *Wistar*, *Rattus norvegicus albinus*, pesando em média 233g, ficaram alojados em gaiolas plásticas específicas, em grupos de cinco animais, com boas condições de iluminação e temperatura ($\pm 26^{\circ}\text{C}$) submetidos a uma dieta comercial e água *ad libitum* durante todo o experimento. Passaram por adaptação no ambiente do biotério por um período de sete dias.

4.1.2.1 Grupos experimentais

Os animais foram alocados randomicamente em quatro grupos experimentais e a aplicação tópica da camomila ocorreu em mucosa jugal direita com auxílio de haste flexível plástica com algodões nas extremidades (Cotonetes, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil):

Grupo Controle/baseline (G1): Cinco animais foram alocados nesse grupo. Três serviram como controle negativo, onde não foi empregada terapêutica ou simulação e dois foram submetidos à aplicação de soro fisiológico (0,9%) em intervalos de 12 horas.

Grupo Camomila Extrato Fluido (G2): Dez animais submetidos à aplicação tópica diária de extrato fluido de camomila (Ad-Muc®, Biolab, São Paulo, Brasil), em intervalos de 12 horas, como preconizado pelo fabricante do medicamento.

Grupo Infusão 1 (G3): Dez animais submetidos a aplicação tópica de infusão de camomila (Chás Real®, Paraná, Brasil), com intervalos de aplicação de 12 horas, até o dia da eutanásia.

Grupo Infusão 2 (G4): Dez animais seguiram o mesmo protocolo do Grupo Infusão 1, entretanto, a aplicação tópica de infusão de camomila ocorreu três vezes ao dia, com intervalo de 08 horas entre as aplicações.

4.1.2.2 Infusão do chá de camomila

As infusões de camomila foram preparadas conforme indicação do fabricante (Chás Real®, Paraná, Brasil). Logo, utilizou-se o correspondente a um sachê para uma

xícara de água fervente, correspondente a 250 mL de água filtrada fervida em chaleira elétrica (Electrolux, Curitiba, Brasil). Após atingir a temperatura de ebulição (100 °C), a água, ainda com temperatura superior a 90°C⁹³, foi despejada em uma caneca e o sachê de camomila (Chás Real®, Paraná, Brasil) foi colocado em infusão com a caneca tampada, durante 3 minutos. Após o preparo, o chá de camomila foi mantido resfriado a uma temperatura entre 20-22°C para uso ao longo de 24 horas; passado esse período, nova infusão de chá foi preparada. A aplicação na mucosa dos animais deu-se em temperatura resfriada.

4.1.2.3 Morte dos animais

Dos cinco animais do grupo controle, três foram sacrificados no dia zero, antes da aplicação tópica da substância, e dois animais tiveram o sacrifício programado para 7º e 14º dias (01 animal/dia) após aplicação tópica da solução salina. Os animais deste grupo serviram de referência para os parâmetros de normalidade. Por se tratarem de animais saudáveis e com mucosa jugal sem alterações, as possibilidades de alterações histológicas eram mínimas. Com isso, não foi necessária a morte de mais animais ao longo dos períodos estabelecidos, o que também está de acordo com as normas de uso científico de animais, estabelecidas na Lei brasileira nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008¹⁰².

Os períodos de morte estabelecidos para os demais grupos experimentais foram 7 e 14 dias após o início da aplicação em mucosa jugal normal (5 animais/dia). Os animais foram eutanasiados por administração de anestésico injetável de 75mg/kg de Ketamina® (Farex do Brasil Ltda. Porto Alegre-Brasil) associado à 10mg/kg de Xilazina® (J.A. Saúde Animal, São Paulo-Brasil), por via intraperitoneal, dose suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal e confirmação da morte.

4.1.2.4 Análise clínica

Ao final do experimento e após a morte dos animais, a mucosa jugal foi avaliada macroscopicamente para verificação de possíveis alterações clínicas.

A mucosa jugal direita dos animais foi avaliada por inspeção visual diariamente durante o período de aplicação tópica das diferentes formulações da camomila. Foram

investigadas possíveis alterações da normalidade da mucosa quanto à cor (semelhante à mucosa adjacente, pálida, avermelhada, amarelada ou pigmentada/coloração), textura superficial (lisa ou rugosa), alterações de relevo, brilho/hidratação (seca/úmida).

4.1.2.5 *Processamento histológico*

Os espécimes de mucosa jugal obtidos por autópsia foram fixados em formalina tamponada a 4%, com pH 7,4 e foram enviados para o processamento histológico de rotina no laboratório de Patologia Oral da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) para obtenção de secções histológicas de 5µm de espessura coradas por Hematoxilina e Eosina (HE).

Para realização da análise qualitativa e quantitativa das fibras colágenas (colágeno total) do tecido conjuntivo, os fragmentos teciduais inclusos em blocos de parafina foram enviados ao Laboratório de Histologia e Embriologia (LHE) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), em Cachoeira-BA, para realização da coloração de Sírius Vermelho.

4.1.2.6 *Análise morfológica e morfométrica*

A calibração dos examinadores para uso do *Software Motic Images Plus 2.0* (Motic Asia, Hong Kong, China), *Software ImageJ* (National Institutes of Health, Bethesda, Md, EUA) e microscópio de luz Quimis BA410 (Quimis, São Paulo, Brasil) acoplado à câmera Moticom 5.0 ocorreu no Laboratório de Bioquímica Oral (LBO) do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da UFBA.

Para evitar o viés de tendenciosidade as análises foram feitas às cegas, através de máscara, no qual os examinadores no momento da análise dos parâmetros não tiveram acesso a qualquer informação referente ao grupo, codificação original da lâmina, identificação numérica do animal ou dias do sacrifício. As análises foram feitas em triplicata pelos mesmos avaliadores, com intervalos semanais.

Com as secções coradas com HE, foi realizada uma análise morfológica no microscópio de luz, em triplicata, de cada secção histológica utilizando-se a objetiva de 10x. A caracterização ocorreu de forma semiquantitativa de acordo com as seguintes categorias: intensa (+++), moderada (++), discreta (+) e ausente (0), conforme Medrado

et al.²³. As variáveis avaliadas foram: a) degeneração da camada basal epitelial; b) presença de infiltrado inflamatório e c) expressão de colágeno. Com as secções coradas com Sírius Vermelho, foi realizada a análise morfológica das fibras colágenas e do padrão de expressão colagênica tecidual, bem como análise quantitativa do percentual da área do colágeno. As análises em triplicata ocorreram com intervalos de uma semana entre elas.

Para a análise morfométrica, utilizou-se o *Software Motic Images Plus 2.0*, e foi realizada a partir da captura de imagens de três áreas distintas de cada uma das secções teciduais, em objetiva de 10x, através do microscópio acoplado à câmera. As mensurações lineares realizadas, em micrômetros, incluíram: a) distância da camada basal à superfície epitelial (DCBSE); b) distância do ápice da crista epitelial para a superfície epitelial (DACESE); c) largura da crista epitelial (LCE); d) distância inter-cristas (DI); e e) espessura da camada córnea (ECC).

A análise quantitativa do percentual de colágeno total em relação à área total do tecido foi realizada pelo *Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Md, EUA)*, com a padronização da área de 720.000 μm^2 da imagem, considerando a altura de 800 μm e o comprimento de 900 μm , por dois examinadores cegos, previamente calibrados, realizada também a partir das capturas de três áreas distintas das secções teciduais na objetiva de 10x.

4.1.2.7 Análise estatística

Os dados coletados foram abrigados em planilhas do *Microsoft Excel 2016* (versão 2016), para análise descritiva com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada, incluindo-se análise quantitativa do percentual de colágeno.

Devido ao tamanho da amostra e ao delineamento do estudo, optou-se por uma análise estatística paramétrica. Os dados do grupo controle não foram considerados para fins de aplicação dos testes de hipóteses.

Os dados das variáveis morfológicas foram apresentados com frequências absolutas e relativas, também com moda.

As variáveis morfométricas DCBSE; DACESE e ECC foram realizadas por análise de variância (ANOVA) “two way”, considerando os fatores de estudo grupo e tempo de sacrificio, bem como a interação entre eles (grupos e tempos de morte).

Para as análises da LCE, DI e porcentagem de área de colágeno em relação à área total foram utilizados modelos lineares generalizados, também considerando os fatores de estudo grupo e tempo de sacrifício, bem como a interação entre eles. Para a variável de porcentagem de área de colágeno em relação à área total os dados foram utilizadas medidas de tendência central expressos em média e de dispersão com desvio padrão. Todas as análises foram realizadas no programa R (*Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria), com nível de significância de 5%.

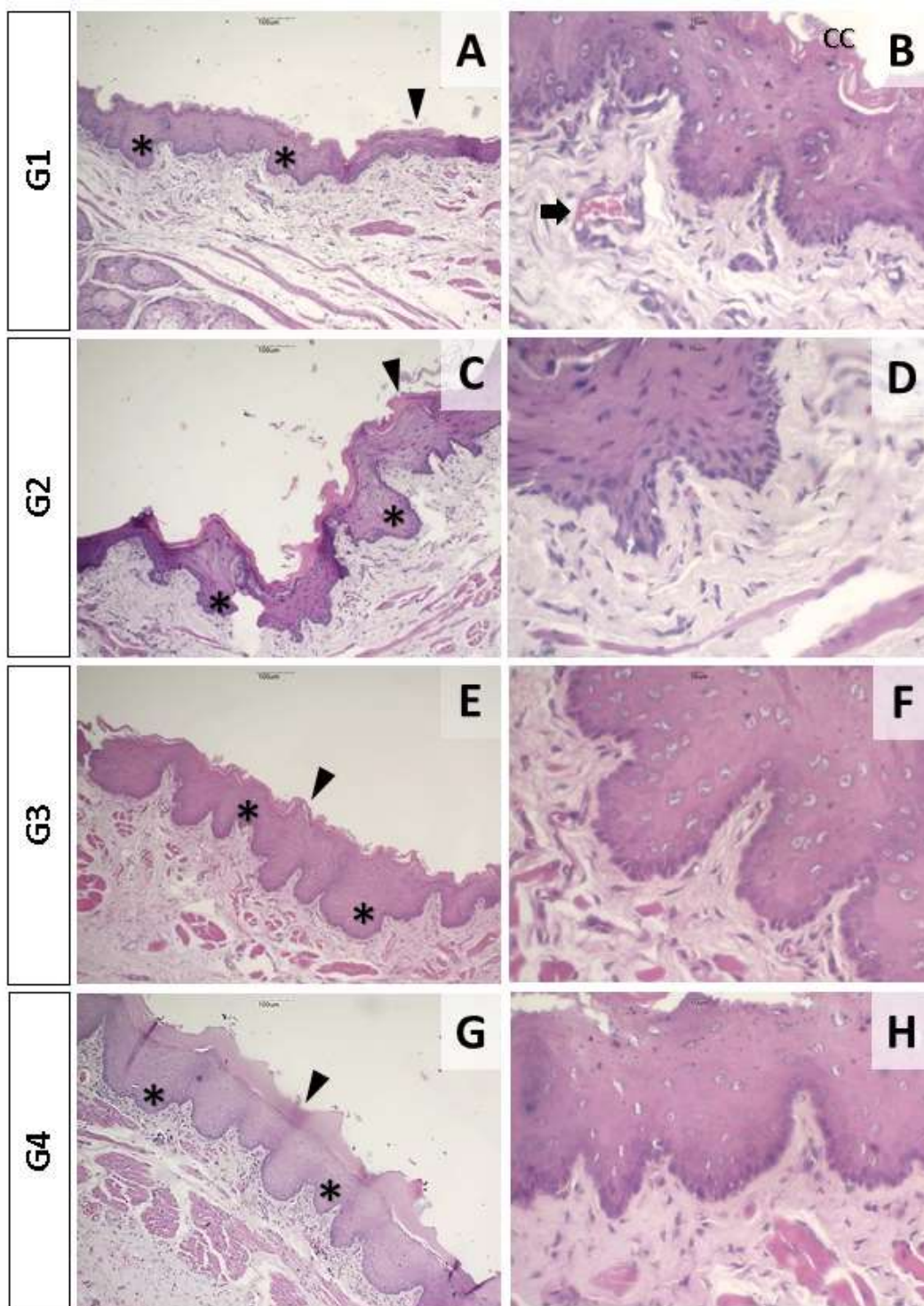
4.1.3 Resultados

A avaliação clínica realizada através de inspeção visual imediatamente após a morte, não evidenciou a presença de alterações nos aspectos de normalidade da superfície da mucosa jugal dos animais quanto à cor, textura superficial, alterações de relevo, brilho/hidratação.

Embora tenha sido feita a análise de todas as secções obtidas, os resultados estatísticos apresentados se referem às análises em HE dos grupos G2, G3 e G4 (Figura 1), onde optou-se por remover 01secção histológica do G3, referente a um caso de 7 dias de sacrifício, por falta de material biológico em boas condições para avaliação

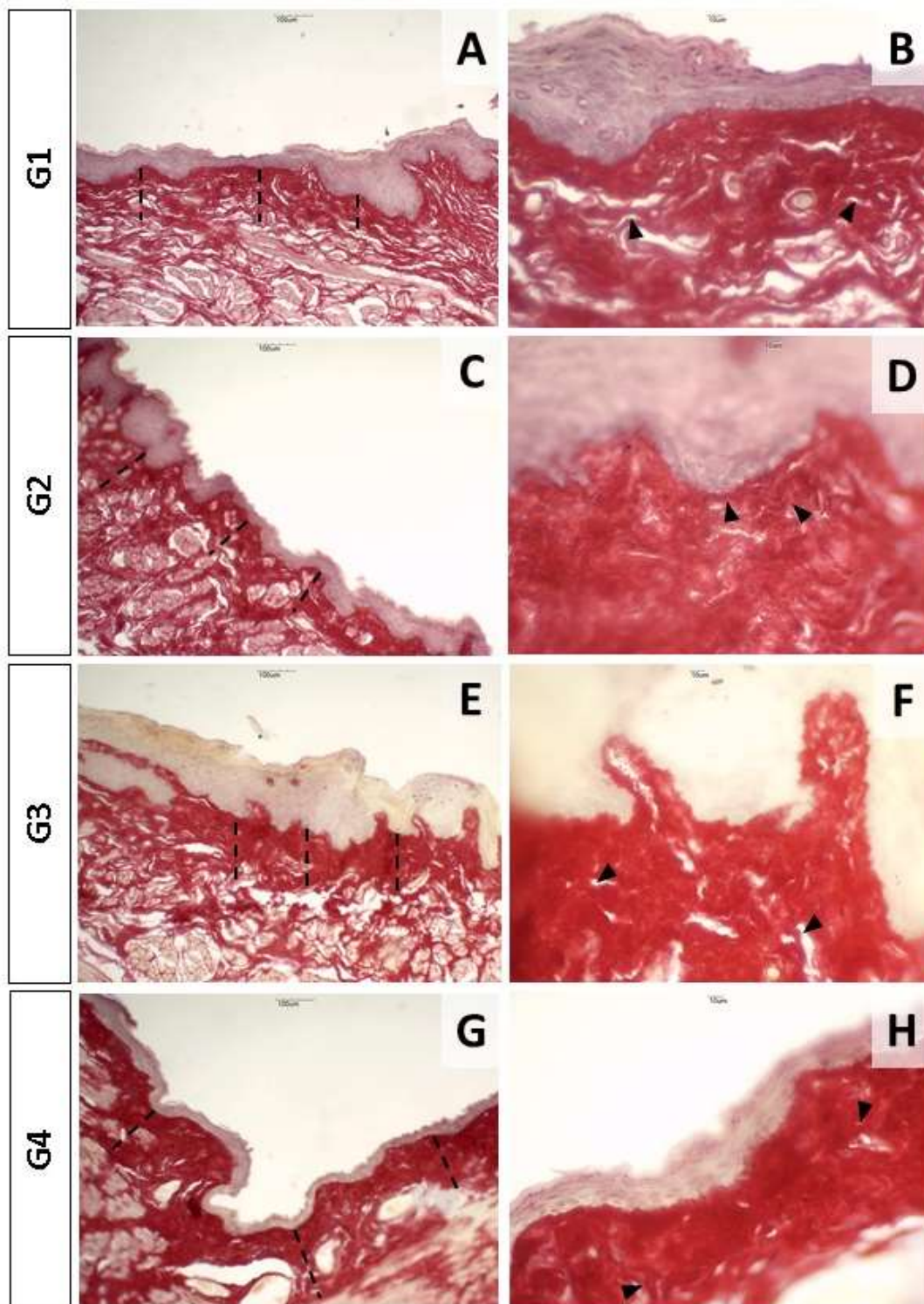
Nas secções histológicas coradas por HE do grupo controle (G1), observou-se uma camada córnea com aspecto de normalidade, presença de cristas epiteliais em toda extensão do epitélio e infiltrado inflamatório mononuclear residente na lâmina própria nos animais de todos os períodos de sacrifício (Figura 1). Independentemente do período investigado, notou-se padronização na expressão de colágeno total. Com relação à degeneração da camada basal, esta foi ausente em todas as secções analisadas. Nas secções coradas com Sírius Vermelho, notou-se presença de fibras colágenas espessas, com feixes densos, dispostas em todos os sentidos (Figura 2).

Figura 1 – Fotomicrografias representativas de seções histológicas coradas por HE vistas na objetiva de 10x (A, C, E e G) e 40x (B, D, F e H) que ilustram a morfologia dos grupos experimentais. Percebe-se espessura do epitélio estratificado pavimentoso ortoceratinizado, com presença de cristas epiteliais (asterisco) ora volumosas, ora discretas. Observa-se também graus variados de espessura de camada córnea (ponta de seta), que caracterizam o padrão histomorfológico da mucosa jugal de ratos. Seta: vaso sanguíneo.



Fonte: LBO/UFBA, 2022

Figura 2 – Fotomicrografias representativas de seções histológicas coradas por Sírius Vermelho com objetiva de 10x (A, C, E, G) e 40x (B, D, F, H) para ilustrar o padrão morfológico das fibras colágenas nos grupos, onde se nota padronização de profundidade de deposição de colágeno (linhas interrompidas) na lâmina própria, com fibras densas (ponta de seta) dispersas em diferentes arranjos organizacionais.



Fonte: LBO/ICS/UFBA, 2022

Quanto ao grupo Extrato Fluido (G2), ao avaliar as características do epitélio com 7 dias e 14 dias de sacrifício, estes se mostravam sem alterações significativas na maior parte da amostra (Figura 1). No que diz respeito à degeneração da camada basal, assim como no grupo Controle (G1), esse parâmetro também se encontrou ausente em todos os períodos investigados (100%) (Tabela 1). Quanto à presença de infiltrado inflamatório mononuclear, este se apresentou de forma discreta em toda a amostra (100%), nos dois períodos de sacrifício. Por fim, no que tange à expressão de colágeno, na maior parte da amostra, se apresentou de maneira discreta (100% em 7 dias e 80% em 14 dias) (Tabela 1). Quanto à análise pela coloração com Sírius Vermelho, as fibras colágenas se apresentaram espessas, dispostas em todos os sentidos, com feixes densos homogêneo em toda a extensão (Figura 2).

Tabela 1 –Distribuição de frequências dos resultados das análises morfológicas em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022).

| Variável | Resultado | G2 | | G3 | | G4 | |
|-----------------------------|-----------|---------------|----------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | | 7 dias n=5 | 14 dias n=5 | 7 dias n=4 | 14 dias n=5 | 7 dias n=5 | 14 dias n=5 |
| Degeneração da camada basal | Ausente | 5 (100,0%) | 5 (100,0%) | 4(100,0%) | 5 (100,0%) | 5(100,0%) | 5 (100,0%) |
| | Discreto | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| | Moderado | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| Infiltrado Inflamatório | Ausente | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 1 (20,0%) | 1 (20,0%) |
| | Discreto | 5 (100,0%) | 5 (100,0%) | 4(100,0%) | 5 (100,0%) | 4 (80,0%) | 4 (80,0%) |
| | Moderado | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| Expressão de colágeno | Ausente | 0 (0,0%) | 1 (20,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) |
| | Discreto | 5 (100,0%) | 4 (80,0%) | 4(100,0%) | 5 (100,0%) | 1 (20,0%) | 2 (40,0%) |
| | Moderado | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 0 (0,0%) | 4 (80,0%) | 3 (60,0%) |

Fonte: autoria própria

No grupo G3 (Infusão 1), as características epiteliais também não apresentaram modificações em seu padrão, em 7 ou 14 dias (Figura 1). Semelhante ao que foi observado no grupo G2, a degeneração da camada basal aqui também foi ausente na totalidade da amostra (100%). A variável de infiltrado inflamatório mononuclear encontrava-se predominantemente discreta nos dois tempos do sacrifício (100% em 7 e 14 dias). A expressão de colágeno, se mostrou totalmente (100%) discreta tanto para quanto 7 e 14 dias (Tabela 1). Pela coloração com Sírius Vermelho, as fibras colágenas também se mostraram espessas dispostas em todos os sentidos, com feixes densos, porém de aspecto fragmentado em parte da amostra (Figura 2).

Por último, no grupo G4 (Infusão 2), o padrão epitelial não se alterou em seus aspectos em nenhum dos dois períodos avaliados (Figura 1). A degeneração da camada basal, assim como nos demais grupos, também estava ausente na integralidade da amostra (100%). Observou-se discreto infiltrado inflamatório na maioria das secções

dos dois tempos (80%). Com relação à expressão de colágeno, esta foi notada de forma moderada na maioria das secções dos períodos (80% em 7 dias e 60% em 14 dias) (Tabela 1). Quanto ao padrão das fibras colágenas, pela coloração do Sírius Vermelho, estas encontravam-se presentes de forma espessas sob feixes densos, dispostos em todos os sentidos (Figura 2).

Os resultados das variáveis morfométricas são apresentados na Tabela 2. Para tal análise, considerou-se os parâmetros do G1 (*baseline*) que incluiu a DCBSE (57,61 μm); a DACESE (111,06 μm); a LCE (60,93 μm); a DI (39,67 μm) e a ECC (18,56 μm). Apesar da mensuração da DCBSE do G2, aos 7 dias, ter apresentado maior valor (95,23 μm) em contraste com o menor valor descrito no G4, aos 14 dias (59,51 μm), que foi o grupo que mais se aproximou a média do *baseline*, tal diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1757$), assim como a DACESE, que aos 14 dias do G2 apresentou o maior valor (165,85 μm) comparado ao menor valor encontrado no G4 aos 14 dias, que também foi o mais próximo do *baseline* (103,28 μm), porém com $p = 0,2040$.

No que diz respeito a LCE, o grupo G2, no período de 7 dias do sacrifício apresentou o maior valor de média (79,07 μm) contrapondo ao menor valor (53,19 μm) encontrado aos 7 dias do G4. Sendo o grupo do 14º dia do G3 (56,23 μm), o que apresentou média mais próxima ao *baseline*. Sem diferença estatisticamente significativa ($p = 0,4862$) entre os grupos.

Aos 14 dias, o mesmo G2, também foi o que apresentou valor de DI (57,32 μm) comparado aos 14 dias do G4, com menor valor de média (40,34 μm), novamente com média mais próxima ao encontrado no *baseline*, com $p = 0,7009$. Por fim, no parâmetro de ECC, os valores médios na amostra variaram de 40,55 μm e 17,61 μm correspondentes aos grupos de 7 dias do G2 e aos 14 dias do G3, respectivamente, com a média descrita do G4, a que mais se aproximou ao grupo *baseline*. No entanto, em termos de avaliação estatística, tal diferença também não foi significativa ($p = 0,1386$).

Observou-se que, apesar de haver divergência nas mensurações das variantes nos grupos investigados ao longo dos tempos, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Considerou-se um percentual para o *baseline* de 48,1 (G1) para o padrão quantitativo de expressão do colágeno total. Nota-se que o valor médio do G2, apresentou maior divergência no percentual de expressão colagênica (aos 7 dias 41,5 e aos 14 dias 37,3) em comparação com os demais períodos e grupos investigados, o que

determinou um p-valor próximo ao limiar ($p=0,0569$), porém ainda sem significância estatística.

Tabela 2 – Média e desvio padrão (DP) das medidas morfométricas (μm) em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022).

| Variável | Estatística | G2 | | G3 | | G4 | |
|------------------------|-------------|--|---------|----------|---------|---------|---------|
| | | 7 dias | 14 dias | 7 dias | 14 dias | 7 dias | 14 dias |
| | | n=5 | n=5 | n=4 | n=5 | n=5 | n=5 |
| DCBSE | Média | 95,23 | 76,84 | 82,79 | 87,87 | 69,52 | 59,51 |
| | (DP) | (27,38) | (20,93) | (24,75) | (26,75) | (23,50) | (39,75) |
| ¹ p-valores | | p(grupos)=0,1757; p(tempo)=0,4631; p(interação)=0,6609 | | | | | |
| DACESE | Média | 163,23 | 165,85 | 126,22 | 156,56 | 133,38 | 103,28 |
| | (DP) | (28,73) | (33,75) | (483,26) | (55,75) | (92,32) | (51,54) |
| ¹ p-valores | | p(grupos)=0,2040; p(tempo)=0,9639; p(interação)=0,5112 | | | | | |
| LCE | Média | 79,07 | 67,73 | 73,20 | 56,23 | 53,19 | 65,68 |
| | (DP) | (13,84) | (12,85) | (13,01) | (16,43) | (31,61) | (23,82) |
| ¹ p-valores | | p(grupos)=0,4862; p(tempo)=0,1437; p(interação)=0,5783 | | | | | |
| DI | Média | 49,16 | 57,32 | 45,37 | 49,55 | 46,51 | 40,34 |
| | (DP) | (20,38) | (10,93) | (21,01) | (11,09) | (29,24) | (10,82) |
| ¹ p-valores | | p(grupos)=0,7009; p(tempo)=0,7208; p(interação)=0,1740 | | | | | |
| ECC | Média | 40,55 | 24,30 | 20,67 | 23,54 | 22,04 | 17,61 |
| | (DP) | (27,37) | (64,71) | (7,62) | (10,08) | (12,04) | (10,49) |
| ¹ p-valores | | p(grupos)=0,1386; p(tempo)=0,2796; p(interação)=0,3598 | | | | | |

¹Para fins da análise estatística não foi considerado o grupo controle. DCBSE: Distância da camada basal a superfície epitelial; DACESE: Distância do ápice da crista a superfície epitelial; LCE: largura da crista epitelial; DI: Distância inter-cristas; ECC: Espessura da camada córnea. DCBSE, DACESE e ECC análise com ANOVA “two way”; LCE, DI análise com modelos lineares generalizados. Fonte: autoria própria.

Para análise do padrão quantitativo de colágeno total obteve-se o total de 30 secções histológicas coradas com Sírius Vermelho, sendo os grupos G1, G2, G3 e G4 composto por: 04, 10, 09 e 07 casos, respectivamente, em função da dificuldade de análise do material biológico de 01 caso referente ao dia 0 dia G1; 01 caso de 7 dias do G3; 01 caso de 7 dias e 02 casos de 14 dias do G4. Assim como nos resultados das secções em HE, as análises referentes ao grupo controle/*baseline* (G1) não foram incluídas na análise estatística, embora analisadas.

Observa-se na Tabela 3 que não houve diferença significativa entre os grupos e os tempos quanto à percentagem de área de colágeno em relação à área total do tecido ($p>0,05$).

Tabela 3 – Média e desvio padrão (DP) da porcentagem de área de colágeno em relação à área total do tecido em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022).

| Grupo | 7 dias | 14 dias |
|---------|---|-------------|
| | Média (DP) | Média (DP) |
| G2 | 41,5 (8,1) | 37,3 (11,2) |
| G3 | 42,1 (5,0) | 47,1 (8,9) |
| G4 | 50,0 (4,4) | 49,1 (5,3) |
| p-valor | p(grupo)=0,0569; p(tempo)=0,9173; p(interação)=0,4928 | |

¹Para fins da análise estatística não foi considerado o grupo controle. Análise com ANOVA “two way”. Fonte: autoria própria

4.1.4 Discussão

Sabe-se que plantas medicinais não são isentas de provocar reações adversas ao organismo, que podem decorrer dos próprios componentes intrínsecos, dosagem inadequada ou presença de contaminantes durante as preparações fitoterápicas^{103,104}.

Em função da popularidade, facilidade de acesso e baixo custo tais substâncias possuem ampla utilização para fins terapêuticos, em especial sob forma de bochechos e orabase na Odontologia^{10,13,16}, além da dificuldade de limitar a utilização destes agentes apenas nas áreas lesionadas, faz-se necessária essa investigação da ação tópica da *M. recutita* também no tecido normal. Neste estudo, as características histológicas propostas para análise são as mesmas encontradas quando um tecido é submetido a danos das mais diversas formas e provoca as alterações teciduais.

Devido à dificuldade em encontrar a descrição do padrão histológico da mucosa oral dos ratos na literatura, os resultados obtidos pelas análises do grupo Controle/*baseline* (G1) serviram como parâmetros de referência para os demais grupos experimentais, por se tratar de amostra de mucosa oral sem exposição aos agentes tópicos deste experimento, justificando a inclusão deste grupo no estudo.

As características de estruturas teciduais da mucosa dos ratos se assemelham à mucosa de humanos, tanto em relação ao epitélio de revestimento quanto à lâmina própria¹⁰⁵, exceto pela presença do estrato córneo. Ao se avaliar o parâmetro ECC, não se observou espessamento do estrato córneo produzido em resposta a um possível estresse, através da maior produção de ceratina¹⁰⁶, tanto no grupo *baseline* quanto nos grupos experimentais. A DCBSE também não evidenciou padrão de espessamento

significativo, o que se caracteriza histologicamente como acantose, que é definida como aumento do estrato espinhoso devido ao maior número de células epiteliais¹⁰⁶. Uma vez que tais parâmetros não demonstraram discrepâncias significativas entre os grupos experimentais, tais achados evidenciam que não houve resposta expressiva a um possível trauma. Este, poderia ter ocorrido pela fricção da haste de algodão no tecido durante a aplicação da substância na região, ou até mesmo em função de estímulo provocado pelas substâncias presentes nas formulações de camomila.

A despeito da possibilidade de trauma pelo uso da haste flexível durante a aplicação tópica do extrato fluido, o trabalho de Myose et al.¹⁰⁷ testou a fricção de instrumentais ou artefatos em mucosa de ratos ao estabelecer um modelo *in vivo* de lesão intraepitelial para avaliar os efeitos na resposta inflamatória de macrófagos. Para tal, os autores utilizaram como metodologia, o uso de haste flexível com extremidades de algodão, outra coberta com gaze, uma escova de tufo e uma de esponja cortada em cubos de 10 mm, 30 vezes com uma carga aplicada de 50g. O dano tecidual foi avaliado quando observado clinicamente imediatamente após a fricção e microscopicamente. Em seus resultados, os autores observaram que dentre os artefatos utilizados, apenas a escova de esponja não foi capaz de provocar lesão intraepitelial, o que comprova que cargas constantes com alguns materiais podem resultar em lesão. Danos macroscópicos como eritema não foram observados, entretanto, o ligeiro aumento de macrófagos nos tecidos subepiteliais mostra que os macrófagos reagiram à lesão mecânica. De forma complementar ao que os autores apresentaram, os achados clínicos e histológicos do presente estudo mostraram que o uso das hastes flexíveis com extremidades de algodão aplicadas duas vezes ao dia, por 7 ou 14 dias, não foi capaz de provocar dano macro ou microscópico ao tecido e que pudessem ser confundidos com alterações teciduais causadas pela aplicação da substância.

Em relação à degeneração da camada basal, representada pela perda da integridade da camada basal¹⁰⁸, o fato desta estar ausente em todos os grupos experimentais indica um fator positivo à camomila, pois demonstra que a aplicação tópica da mesma, independente da forma de veiculação, não foi capaz de provocar dano aos tecidos avaliados durante os 14 dias do experimento.

Quanto à presença de infiltrado inflamatório mononuclear, observações características do processo inflamatório^{106,109}, que se apresentaram de ausentes a discretos nos grupos experimentais em ambos os tempos de sacrifício, percebe-se similaridade com o grupo Controle/*baseline* (G1). Cabe ressaltar que, além da matriz

extracelular, o tecido conjuntivo é também composto por células residentes próprias, a exemplo dos macrófagos, mastócitos e leucócitos, capazes de agir inicialmente frente à uma agressão¹¹⁰. Tal característica explica a presença do discreto infiltrado inflamatório observado nas secções avaliadas. Uma vez que a resposta inflamatória é decorrente de um dano, pode-se sugerir então que houve ausência de lesão tecidual em qualquer das formas de apresentação e posologia da camomila. Esta ausência de efeitos adversos e a boa tolerância tecidual ficam evidentes em diversos estudos^{10,11,13,28}, que tiveram como finalidade observar o efeito anti-inflamatório da camomila.

No estudo de Oliveira et al.⁹, os autores avaliaram o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e apoptose em úlceras induzidas na mucosa jugal esquerda de ratos divididos em 5 grupos: animais tratados com solução salina (grupo controle negativo/ratos normoglicêmicos e grupo controle positivo/ratos diabéticos); animais tratados com extrato de camomila (ratos normoglicêmicos e ratos diabéticos) e; animais diabéticos tratados com triancinolona. Após dez dias do experimento, a análise histológica mostrou que o grupo controle negativo e o grupo camomila com ratos diabéticos apresentaram a pontuação 1 no score, representada por ausência de úlcera, fibrose e infiltrado inflamatório crônico; o grupo controle positivo pontuou score 2, pois apresentava ulceração epitelial; o grupo triancinolona teve um score 4, caracterizado pela presença de úlcera e intenso processo inflamatório agudo e; o grupo camomila de animais normoglicêmicos mostrou epitélio totalmente remodelado e sem inflamação, o que representou o score 0. Os autores atribuíram os resultados favoráveis da camomila à capacidade anti-inflamatória oriunda dos seus compostos bioativos, capazes de inibir a ciclooxigenase-2 e síntese de mediadores inflamatórios. Além disso, relatam que o alfa-bisabolol presente na camomila está relacionado com a formação de tecido de granulação durante o processo de reparo de feridas. Importa ressaltar que, também neste estudo, não há informações sobre o tecido normal, que não foi submetido à dano.

Salum, Cherubini, Amenábar¹⁰⁵, em seu estudo experimental, caracterizaram a mucosa oral de diferentes modelos animais utilizados comumente em pesquisas. Ao avaliar a mucosa jugal de um rato (*Ratus norvegicus*), descrevem que a espessura epitelial encontrada variou de 40 a 80 μm , sendo destes, 7 a 20 μm de espessura da ceratina. Tais resultados encontram-se discretamente diferentes dos descritos neste estudo, visto que a espessura da camada epitelial (DCBSE) variou aproximadamente entre 59 e 95 μm e a espessura da camada córnea (ECC) de 17 a 40 μm . Essas diferenças de dados apresentado pelos autores com o presente estudo podem ser

decorrentes da diferença do n amostral, visto que no estudo citado, apenas um animal foi utilizado para análise. A dificuldade em obter estudos comparativos ou que incluam os aspectos de normalidade dos tecidos destes animais justificam a relevância deste trabalho e deve ser fator estimulante para outras publicações contendo estas informações.

No presente estudo, apesar dos resultados morfométricos de tais medidas lineares (DCBSE e ECC) nos grupos experimentais terem sido divergentes do Controle/*baseline*, com tendência à médias mais elevadas, quando comparadas entre si (G2, G3 e G4) não foram observadas diferenças significativas. Dessa forma, sugere-se que o discreto espessamento da camada epitelial e a ceratinização superficial, bem como a presença das cristas epiteliais descritas sejam característicos da espécie investigada. Entretanto, sugerem-se novos estudos, com maior número amostral, para confirmar estes resultados.

Salum et al.¹¹¹, realizaram uma avaliação histológica na mucosa da bolsa jugal de sessenta e seis hamsters após aplicação do tiocianato tópico (dosagens diárias de 55 mg/kg do gel por peso corporal), um íon que estimula o sistema enzimático da peroxidase salivar, com o objetivo de verificar se tal substância intensificaria a atividade proliferativa epitelial e seria capaz de interferir na deposição da queratina. Os autores mensuraram a espessura do epitélio e do estrato córneo, no grupo controle e encontraram médias de 34,21 e 6,40 μm , respectivamente, no grupo experimental, as médias obtidas foram de 34,57 e 5,95 μm para os mesmos parâmetros investigados. A espessura do epitélio não exibiu diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados ($p=0,677$). No entanto, a espessura do estrato córneo apresentou diferença estatística entre os dois grupos avaliados, sendo a média do grupo experimental inferior à do grupo controle ($p=0,035$), segundo os autores, o aumento na frequência de células claras e diminuição na altura do estrato córneo promovidos pela administração do íon, pode estar associado ao aumento da hidrofilia de ceratina. Apesar da diferença descrita, os autores concluíram que o tiocianato não foi capaz de promover a intensificação da atividade proliferativa epitelial e incremento da queratina, como esperado, logo, sem alterações macroscópicas e histológicas importantes. Apesar da descrição dos aspectos epiteliais neste estudo, não foi possível comparar tais parâmetros com a presente investigação em virtude das diferentes substâncias utilizadas e espécies envolvidas.

Não foram encontrados estudos prévios na literatura consultada que tragam resultados quantitativos sobre o padrão das cristas epiteliais em ratos. A ausência de

cristas epiteliais foi descrita por Pinto¹¹² como uma característica histológica da bolsa jugal de hamsters. Com isso, os resultados das médias baixas relativas a DACESE, LCE e DI encontrados no presente estudo em todos os grupos experimentais, incluindo o grupo Controle/*baseline* (G1), demonstram apenas a presença de uma interface menos imbricada entre os tecidos analisados.

Em um tecido normal, o padrão de deposição do colágeno resulta do balanço entre a síntese e degradação das fibras, que por sua vez condiz com o processo de formação da matriz extracelular¹¹³. Segundo Pinto¹¹², a lâmina própria da mucosa oral de hamsters apresenta concentração significativa de fibras colágenas, o que diferiu do padrão discreto encontrado nas secções teciduais analisadas na presente investigação, entretanto, tal achado sugere ausência de alteração tecidual, visto que todos os períodos e grupos investigados apresentaram tal aspecto. Com isso, sugere-se mais uma vez que a camomila aplicada de forma sistematizada não interferiu no aspecto de normalidade do tecido.

Estudos experimentais em modelo animal, com uso tópico de outras plantas medicinais, são descritos na literatura, como o de Abu-Al-Basal¹¹⁴, que utilizou camundongos diabéticos para avaliar a eficácia do extrato aquoso por via intraperitoneal e o uso tópico do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, na cicatrização cutânea. Os autores avaliaram a área de cicatrização por um cálculo através de imagem digitalizada, e realizaram análise histológica com as secções coradas em HE e Tricromo de Masson. Segundo os autores, diferenças significativas foram encontradas entre os grupos que receberam as terapêuticas em comparação ao grupo controle, em diferentes aspectos do processo de cicatrização de feridas diabéticas, como na contração da ferida cutânea, reepitelização, regeneração do tecido de granulação, angiogênese e deposição de colágeno. Na presente investigação, como não havia área de ferimento a ser mensurada, apenas inspeção visual da mucosa foi realizada em busca de possíveis alterações de superfície nos animais submetidos a aplicação tópica, não sendo observadas modificações dos aspectos clínicos. Utilizou-se também secções coradas em HE para análise morfológica e morfofométrica tecidual e ainda coloração de Sírius Vermelho para análise do colágeno.

As secções coradas com Sírius Vermelho possibilitaram ainda a análise quantitativa do percentual de expressão colagênica, o que minimiza a subjetividade da análise descritiva através da comparação numérica entre os grupos, e confirma que a aplicação tópica do fitoterápico não foi capaz de gerar estímulo de biossíntese ou

degradação de colágeno tecidual, que poderia ser percebido pela alteração da expressão das fibras colágenas nos tempos estudados¹¹⁵.

Cavalcanti et al.¹¹⁶ também em um modelo experimental, investigaram a ação do uso de uma formulação farmacêutica tópica, desenvolvida incluindo óleo essencial extraído das folhas de *Croton zehntneri*, na cicatrização cutânea de camundongos. Além da análise semiquantitativa macroscópica do edema e da contagem do número de capilares e leucócitos com secções coradas em HE, secções coradas com Tricromo de Masson foram utilizadas para análise quantitativa de fibroblastos e fibras colágenas presentes na fotomicrografia obtida. Diferente do método morfométrico utilizado na presente investigação, a quantificação do conteúdo de colágeno foi realizada segundo os autores com a contagem de todas as fibras, independentemente da espessura, por cinco campos randomizados, de seis amostras em cada grupo. Segundo os autores, no 15º dia de investigação, os grupos tratados com óleo essencial de *Croton zehntneri* a 20%, bem como com 20% de trans-anetole, obtiveram aumento significativo no número de fibras de colágeno em comparação com o controle e os animais tratados com dexametasona. Este resultado difere do presente estudo, visto que não foram observadas diferenças quantitativas nos grupos experimentais, com a metodologia utilizada.

O método morfométrico empregado para contagem do percentual de colágeno, se assemelha ao utilizado no estudo de Fortuna et al.¹¹⁷, onde quarenta ratos *Wistar* foram submetidos à cirurgia cutânea, para caracterização da densidade vascular e o processo de fibroplasia após os estágios de reparação tecidual, através da média quantitativa por pixel, constatou-se que houve maior expressão de fibras colágenas no grupo que recebeu ação fotobiomoduladora do laser com 4 J/cm² (3949 pixels em 14 dias e 3828 pixels em 21 dias) quando comparado ao grupo controle, com animais irradiados com laser desligado (1876 pixels em 14 dias e 21 dias com 2885 pixels), com significância estatística de p=0,008 e p=0,016, respectivamente, que foi relacionado aos efeitos primários resultantes da estimulação pelo laser, como o aumento do número de fibroblastos, miofibroblastos e expressão de colágeno. Todavia, mais uma vez importa ressaltar a ausência de uma lesão tecidual prévia às análises da presente investigação, o que dificulta a comparação de resultados.

A análise do padrão de deposição do colágeno após dano tecidual, há tempos é investigada na literatura, em especial em estudos que tratam da fotobiomodulação a laser no tecido de reparo^{3,23,118}. É importante entender que a inclusão deste trabalho nesta discussão, visa esclarecer que existem agentes externos capazes de interferir na

produção e deposição colagênica. Ainda, justifica-se a inclusão desses autores pela dificuldade em identificar publicações que exibam padrão tecidual após aplicação de fitoterápicos.

Por sua vez, Oliveira et al.⁹, também avaliou o percentual de deposição do colágeno pela coloração de Sírius Vermelho. Os autores identificaram que o grupo controle negativo, grupo controle positivo e o grupo camomila de ratos normoglicêmicos foram os que mostraram aumento na colagênese do 5º ao 10º dia do experimento, comparado aos animais diabéticos dos grupos tratados com camomila e com triancinolona, que pode estar relacionado ao fato da hiperglicemia modificar o perfil biológico de deposição de colágeno, que acaba por interferir na cicatrização das feridas.

Vale lembrar que, diferente destes estudos, o presente trabalho avaliou a expressão de colágeno de tecido que não passou por um dano prévio, com isso, os resultados mostram que não houve estímulo da produção colagênica através da ação tópica da camomila, indicando boa tolerância dos tecidos na presença deste fitoterápico. O fato do p-valor para grupos terem sido próximos ao limiar ($p=0,0569$), podem ser justificados pelo quantitativo da amostra, mas que ainda assim não houve diferença estatística nos dois períodos e em todos os grupos.

Apesar de alguns autores relatarem em seus estudos a ação genotóxica de componentes bioativos da camomila, como flavonóides que possuem potencial antiproliferativo^{119,120}, a capacidade anti-genotóxica deste fitoterápico também é descrita na literatura por outros grupos de pesquisa, em modelos experimentais com camundongos, bulbos de *Allium cepa*, *Drosophila melanogaster*^{65,121,122}. Tal contraposição entre autores, traz em evidência a necessidade de pesquisas acerca dos efeitos da camomila sobre os tecidos normais. Dessa forma, sugere-se que novos estudos devam ser realizados com amostras maiores, outras formas de posologia e veículos de aplicação dos fitoterápicos, bem como outras formas de análise tecidual. Ainda assim, os resultados encontrados no presente estudo reafirmam a hipótese de que a aplicação tópica da camomila não foi capaz de provocar dano tecidual na amostra estudada, através de uma análise histomorfométrica.

4.1.5 Conclusão

Neste estudo, os parâmetros clínicos, morfológicos e morfométricos avaliados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais. Dessa forma, o uso tópico da camomila não promoveu alterações no padrão histológico da mucosa oral normal de ratos. Assim, a camomila pode ser considerada um agente terapêutico bem tolerado pelos tecidos, além de ser uma alternativa economicamente viável para o manejo de lesões inflamatórias em cavidade oral.

4.2 ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA *MATRICARIA RECUTITA* ISOLADA OU EM ASSOCIAÇÃO À TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS

Tila Fortuna¹, Juliana Borges Dantas¹, Rejane Conceição Santana², Hortência Resende Della Cella³, Elisângela de Jesus Campos⁴, Gabriela Botelho Martins⁵

1 Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas. Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS, UFBA).

2 Doutora em Patologia humana pela UFBA. Professora Associado do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS, UFBA). 3 Graduanda de Odontologia. Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA).

4 Doutora em Medicina e Saúde pela UFBA. Professora Associado do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS, UFBA).

5 Doutora em Estomatologia Clínica pela PUCRS. Professora Associado do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (ICS, UFBA).

Endereço de Correspondência:

Tila Fortuna

Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. CEP 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil.

Tel.: (+55) (71) 3283-8891

E-mail: tilafortuna@gmail.com

Resumo

Introdução: A terapia da Fotobiomodulação laser (TFBML) mostra-se como um dos possíveis agentes moduladores da inflamação. De igual modo, plantas medicinais, como a camomila (*M. recutita*) também são utilizadas com o mesmo fim. **Objetivo:** Avaliar o reparo tecidual em dorso de língua de ratos sob o uso tópico da camomila isolada e em associação com a TFBML. **Materiais e Métodos:** Setenta e cinco ratos *Wistar* machos, foram submetidos à realização de uma ferida padronizada em dorso lingual e alocados nos grupos: Controle (G1), Extrato fluido camomila (G2), Infusão camomila (G3), Laser (G4), Infusão camomila + Laser (G5). A eutanásia ocorreu nos dias 3, 7 e 14 após

cirurgia. As úlceras foram medidas com paquímetro. Secções coradas com Hematoxilina e Eosina e Sírius Vermelho permitiram avaliação do edema, infiltrado inflamatório, celularidade, re-epitelização e caracterização do colágeno total. Análises histomorfométricas do percentual de colágeno total, da distância da camada basal a superfície epitelial e espessura da camada córnea foram realizadas. **Resultados:** Os grupos G2 e G4 modularam as fases exsudativa e proliferativa da inflamação, tanto clínica como histologicamente. Os grupos G3 e G5 não mostraram diferenças significativas em relação ao G1 na maioria dos parâmetros avaliados. **Conclusão:** O extrato fluido da camomila e a TFBML isoladamente apresentaram melhores respostas clínicas e histológicas para o reparo tecidual do que a associação entre estas modalidades terapêuticas. Houve diferença nos parâmetros dos padrões clínicos, histológicos e histomorfométricos entre os grupos experimentais da presente investigação. A TFBML mostrou-se superior nas análises realizadas.

Palavras-chave: Camomila. Matricaria. Terapia com Luz de Baixa Intensidade. Terapia a Laser. Mucosa Bucal.

Abstract

Introduction: Laser photobiomodulation therapy (LPBMT) is shown as one of the possible modulating agents of inflammation. Similarly, medicinal plants, such as chamomile (*M. recutita*) are also used with the same purpose. **Objective:** To evaluate tissue repair in the dorsum of the tongue of rats under topical use of chamomile alone and in association with LPBMT. **Materials and Methods:** Seventy-five male *Wistar* rats underwent a standardized wound on the dorsum of the tongue and were allocated into experimental groups: Control (G1), Chamomile Fluid extract (G2), Chamomile Infusion (G3), Laser (G4), Chamomile Infusion + Laser (G5). Euthanasia took place on days 3, 7 and 14 after surgery. Ulcers were evaluated and measured with a caliper. Sections stained with hematoxylin and eosin and Sirius Red allowed evaluation of edema, inflammatory infiltrate, cellularity, re-epithelialization and characterization of total collagen. Histomorphometric analyzes of the percentage of total collagen, the distance from the basal layer to the epithelial surface and the thickness of the stratum corneum were performed. **Results:** The G2 and G4 groups modulated the exudative and proliferative phases of inflammation, both clinically and histologically. The G3 and G5 groups did not show significant differences in relation to the G1 group in most of the evaluated parameters. **Conclusion:** Chamomilefluid extract and TFBML alone showed better clinical and histological responses for tissue repair than the association between these therapeutic modalities. There were differences in the parameters of clinical, histological and histomorphometric patterns between the experimental groups of the present investigation. The TFBML proved to be superior in the performed analyses

Keywords: Chamomile. Matricaria. Low-Level Light Therapy. Laser Therapy. Mouth Mucosa.

4.2.1 Introdução

O reparo tecidual é uma resposta complexa e coordenada do organismo, que consiste em fases bem definidas¹²³, dependente da ativação, recrutamento e atividade de diferentes tipos celulares, incluindo queratinócitos, células endoteliais, fibroblastos e células inflamatórias¹²⁴.

Algumas terapias capazes de modular tais fases deste fenômeno, como a hemostasia, fase inflamatória exsudativa, proliferativa e de remodelamento tecidual, vem sendo investigadas na literatura^{3,23,42}. A terapia da Fotobiomodulação laser (TFBML) mostra-se como um dos possíveis agentes moduladores, capaz de acelerar a fase aguda da inflamação, estimular a proliferação celular, aumentar a contração de feridas cutâneas e acelerar a re-epitelização. A TFBML ainda proporciona redução do edema e uma rápida transição do contingente de células inflamatórias polimorfonucleares para o infiltrado monomorfonuclear, associado ao aumento da síntese de fibras colágenas e incremento do padrão de organização dos componentes fibrilares da matriz extracelular^{23,42}.

De igual modo, por possuírem atividade antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória e angiogênica⁶⁴, algumas plantas medicinais também são amplamente utilizadas como moduladoras da inflamação devido ao baixo custo, origem natural e menor possibilidade de efeitos colaterais descritos⁶⁰.

A camomila (*M. recutita*) é uma das plantas medicinais de fácil acesso à população, cujas flores apresentam propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, antiespasmódicas e sedativas⁶³. Seus principais componentes incluem inúmeros compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, aspegenina, quercetina, patuletin, luteolina e seus glicosídeos⁶.

Diversas são as publicações^{8,12,16} que investigam o uso de agentes terapêuticos para o tratamento das afecções orais, incluindo úlceras traumáticas²⁷, ulcerações aftosas recorrentes¹⁰ e mucosite oral^{16,92}. É estabelecido que o uso isolado da TFBML³¹⁻³³ e o uso tópico da camomila²⁸⁻³⁰ são capazes de modular a inflamação e conseqüentemente o reparo tecidual^{23,40-42}. Entretanto, não consta na literatura investigada, trabalhos sobre a associação de ambos os agentes para verificar se há benefício do uso destes moduladores em forma conjunta, em especial na mucosa oral.

Dessa forma, o presente trabalho, objetiva avaliar reparo tecidual em dorso de língua de ratos sob o uso tópico da camomila isolada e em associação com a TFBML.

4.2.2 Materiais e métodos

4.2.2.1 Trabalho Experimental com Modelo Animal

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do ICS/UFBA sob número 3562050618, setenta e cinco (75) ratos machos *Wistar*, *Rattus norvegicus albinus*, pesando em média 238g, ficaram alojados em gaiolas plásticas específicas, em grupos de cinco, com boas condições de iluminação e temperatura ($\pm 26^{\circ}\text{C}$) submetidos a uma dieta comercial (Ração Nuvilab, Quimtia, Colombo-PR, Brasil) e água *ad libitum* durante todo o experimento. Passaram por adaptação no ambiente do biotério por um período de sete dias.

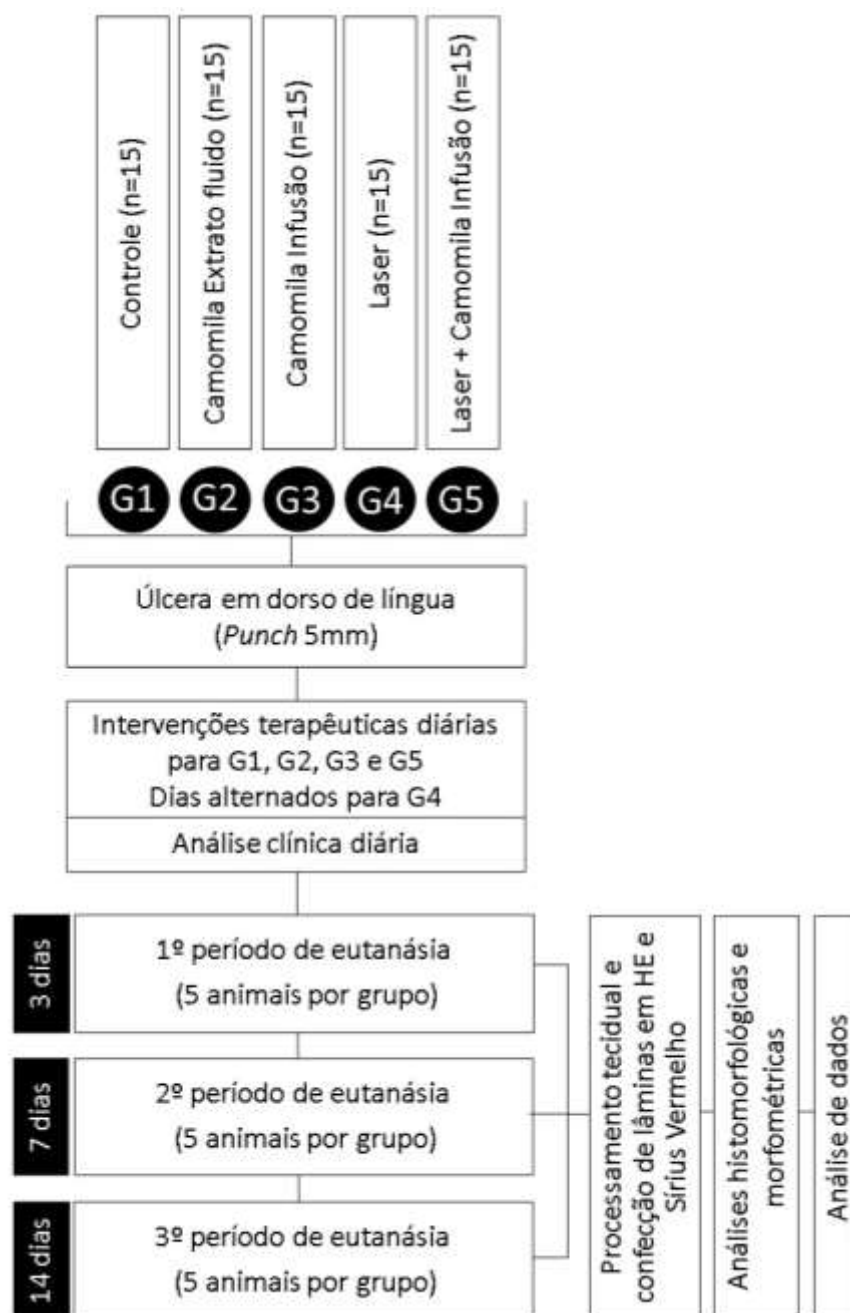
4.2.2.2 Procedimento cirúrgico

Após pesagem com balança (Toledo, São Bernardo do Campo-SP, Brasil), os animais foram anestesiados com uma mistura Ketamina® (Farex do Brasil Ltda. Porto Alegre-Brasil) e Xilazina® (J.A. Saúde Animal, São Paulo-Brasil) na proporção de 90mg/kg e 5mg/kg, respectivamente por via intraperitoneal. Uma porção circular de mucosa no centro do dorso da língua foi removida utilizando-se bisturi circular de 5 mm de diâmetro (Biopsy Punch, Stiefel, Alemanha) para a obtenção de uma ferida uniforme e padronizada, com aproximadamente 1 mm de profundidade, limitada à mucosa e sem comprometimento muscular. A ferida foi medida com o uso de paquímetro analógico de 150 mm (Zaas, Florianópolis, Brasil), por um único avaliador, previamente calibrado.

4.2.2.3 Grupos experimentais

Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram alocados aleatoriamente em cinco grupos experimentais (Figura 1):

Figura 1 – Fluxograma que representa as etapas do estudo



Fonte: LBO/UFBA, 2022.

Grupo Controle (G1): Quinze animais submetidos à aplicação de soro fisiológico (0,9%) com uso de haste flexível plástica com algodões nas extremidades (Cotonetes, Johnson & Johnson, São Paulo, Brasil) e simulação de irradiação com TFBML em dias alternados, com aparelho desligado.

Grupo Extrato Fluido (G2): Quinze animais com feridas tratadas com aplicação tópica de extrato fluido de camomila (Ad-Muc[®], Biolab, São Paulo, Brasil) com auxílio de haste flexível plástica com algodões nas extremidades, em intervalos de 12 horas, diariamente, como preconizado pelo fabricante do medicamento, sendo a primeira dose imediatamente após a cirurgia.

Grupo Infusão Camomila (G3): Quinze animais submetidos à aplicação tópica de infusão de camomila obtidas através da infusão de 01 sachê (*Chás Real*[®], Paraná, Brasil) submersos em de 250 mL de água fervente por 3 minutos, conforme orientação do fabricante, refrigerado à temperatura de 20-22°C, armazenados por um período de até 24 horas, aplicado com intervalos de 08 horas, com auxílio de um conta gotas.

Grupo Laser (G4): Quinze animais irradiados com aparelho de laser diodo semiconductor (Laser DMC Therapy EC, São Paulo, Brasil) de AsGaAl em emissão contínua, com potência máxima de saída de 100mW, área da ponta ativa do aparelho de 0,028cm², comprimento de onda de 660nm, aplicado em dias alternados. A dosimetria utilizada foi de 35 J/cm², 1J no centro da ferida, por 10 segundos, iniciado no dia do procedimento cirúrgico

Grupo Infusão Camomila + Laser (G5): Quinze animais tratados com ambas as terapêuticas, conforme descrito para os grupos isolados, iniciando-se pela irradiação laser prévia à aplicação da infusão de camomila no primeiro horário de tratamento da aplicação tópica da camomila com intervalos de 08 horas.

Para a realização dos procedimentos de aplicação dos fármacos, os animais não precisaram ser anestesiados. Foram contidos por um dispositivo plástico atraumático, conforme modelo utilizado por Martins⁹⁴ e Pelisser, Vier-Pelisser, Fontanella, Figueiredo⁹⁵, causando mínimo estresse aos animais.

4.2.2.4 Avaliação clínica

Características macroscópicas do processo de reparo das úlceras foram analisadas diariamente com o auxílio de luz ambiente, espátulas de madeira e elásticos para auxílio na abertura de boca dos animais. Tal avaliação obteve a classificação "presente", quando eram observados sinais clínicos da presença da úlcera, e "ausente", quando a úlcera se encontrava ausente e o processo de reparo da úlcera havia sido completado macroscopicamente.

Nos dias da eutanásia, a inspeção visual foi mais precisa e, com o auxílio de um paquímetro, o diâmetro da ferida foi registrado quando ainda presente, e a mensuração correspondia ao longo eixo da língua dos animais.

4.2.2.5 Morte dos animais

Os animais foram eutanasiados por administração de 90mg/kg de Ketamina® associada à 10mg/kg de Xilazina®, por via intraperitoneal, dose suficiente para produzir a ausência do reflexo corneal e confirmação da morte. Os períodos de morte estabelecidos foram de 3, 7 e 14 dias após a cirurgia em mucosa de dorso lingual.

4.2.2.6 Processamento histológico

Após constatação do óbito, a língua dos animais foi removida com auxílio de uma lâmina de bisturi nº 15 (Descarpack, Santa Catarina, Brasil) e uma tesoura goldman fox (Golgran, São Paulo, Brasil), cujo fragmento foi fixado em formalina tamponada a 4%, com pH 7,4 e posteriormente enviado para o processamento histológico de rotina no Laboratório de Histologia e Embriologia (LHE) da Faculdade Adventista da Bahia (FADBA), em Cachoeira-BA para obtenção de lâminas coradas por Hematoxilina e Eosina (HE) e Sírius Vermelho.

4.2.2.7 Avaliação morfológica e morfométrica

Análise histológica das secções coradas por HE foram feitas por um examinador previamente calibrado e cego, onde a presença de edema, infiltrado inflamatório e celularidade foram avaliados de forma semi-quantitativa, codificadas com os escores que variaram de intensa (+++), moderada (++) , discreta (+) e ausente (0), conforme descrito por Medrado et al.²³. A análise ocorreu em triplicata, com intervalo mínimo de uma semana entre elas.

Em tempo, com as mesmas secções, foi avaliado ainda, e também em triplicata, a predominância característica do tipo de infiltrado inflamatório, categorizado como polimorfonuclear ou monomorfonuclear e o grau de re-epitelização tecidual,

classificado como: ausente, parcial e completa, podendo esta última ser organizada ou desorganizada.

Na análise morfológica das secções coradas com Sírius Vermelho avaliou-se o padrão de deposição das fibras colágenas, a espessura dessas fibras, se espessas ou delicadas, o padrão de alongamento, se fragmentadas e não fragmentadas, e a profundidade de deposição das fibras no local da ferida, classificada como normal ou aumentada.

Para a análise morfométrica, utilizou-se o *Software Motic Images Plus 2.0* (Motic, Barcelona, Espanha), e foi realizada a partir da captura de imagens de três áreas distintas de cada uma das bordas (bordas direita e esquerda) e do centro da ferida contida nas secções teciduais coradas em HE, em objetiva de 10x, através da câmera acoplada ao microscópio. Nos casos em que não havia úlcera presente, o número 0 (zero) foi atribuído como medida. As mensurações lineares, realizadas em μm , incluíram: a distância da camada basal à superfície epitelial (DCBSE) e a espessura da camada córnea (ECC).

A análise quantitativa do percentual de colágeno total em relação à área total do tecido foi realizada pelo uso de um *software* livre, *ImageJ* (*National Institutes of Health*, Bethesda, Md, EUA), com a padronização da área de $720.000 \mu\text{m}^2$ da imagem, considerando a altura de $800 \mu\text{m}$ e o comprimento de $900 \mu\text{m}$. Foi executada por dois examinadores cegos, previamente calibrados, também a partir das capturas de três áreas distintas das secções teciduais das duas bordas e centro da úlcera, coradas em Sírius Vermelho, na objetiva de 10x.

4.2.2.8 Análise estatística

Foi criado um banco de dados no *Microsoft Excel 2016* (versão 2016), para análise descritiva com a finalidade de identificar as características gerais e específicas da amostra estudada, incluindo-se análise quantitativa do percentual de colágeno.

Os dados das variáveis morfológicas foram apresentados com frequências absolutas e relativas e moda.

Foram realizadas análises de reprodutibilidade inter avaliador para as variáveis porcentagem de área de colágeno e medida morfométrica linear. Para isso foram utilizados teste *t* pareado e análise de correlação intraclasse. A interpretação do coeficiente de correlação intraclasse (CCI) foi feita de acordo com Fleiss, Levin, Paik

¹²⁴, que considera coeficientes abaixo de 0,40 como pobre, de 0,40 até abaixo de 0,75 satisfatória e igual ou acima de 0,75 como excelente. A seguir foi realizada a média dos dois avaliadores para essas variáveis.

Foram então realizadas análises descritivas e exploratórias dos dados. Modelos lineares foram utilizados considerando os efeitos de grupo e tempo, bem como a interação entre eles, para analisar a porcentagem de área de colágeno. Para medidas morfométricas foram considerados no modelo os efeitos de grupo, tempo e ECC, bem como as interações duplas e tripla entre eles. Para a avaliação clínica da úlcera foi utilizado um modelo linear generalizado misto para medidas repetidas no tempo. As associações entre o grupo e presença de úlcera foram analisadas pelo teste Exato de Fisher. Todas as análises foram realizadas no programa R (*Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Áustria), com nível de significância de 5%.

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Análise clínica

Na análise clínica do número de animais com presença de úlcera nos respectivos grupos, ao longo do tempo (Tabela 1), pôde-se observar que, do oitavo ao décimo segundo dia houve diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$). No grupo G1, no oitavo dia, todos os animais apresentavam úlcera, já no grupo G3, 20% dos animais apresentavam úlcera nesse mesmo período de tempo, enquanto no grupo G4 nenhum animal apresentava úlcera no oitavo dia. O tempo exato para que todos os animais de cada um dos grupos deixassem de apresentar úlcera foi de 14, 9, 9, 8 e 10 dias nos grupos G1, G2, G3, G4 e G5, respectivamente, exibindo melhor tempo para o grupo TFBML (G4) e tempo semelhante para as duas formulações da camomila (G2 e G3).

Tabela 1 - Número de animais com úlcera/número total de animais no grupo (%), em cada grupo, no decorrer do tempo (LBO/UFBA, 2022).

| Dia | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | p-valor |
|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| D0 | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | - |
| D1 | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | - |
| D2 | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | - |
| D3 | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 15/15 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | 16/16 (100,0%) | - |
| D4 | 10/10 (100,0%) | 11/11 (100,0%) | 8/10 (80,0%) | 11/11 (100,0%) | 11/11 (100,0%) | 0,0653 |
| D5 | 10/10 (100,0%) | 11/11 (100,0%) | 8/10 (80,0%) | 10/11 (90,9%) | 10/11 (90,9%) | 0,4127 |
| D6 | 10/10 (100,0%) | 11/11 (100,0%) | 7/10 (70,0%) | 10/11 (90,9%) | 10/11 (90,9%) | 0,1315 |
| D7 | 10/10 (100,0%) | 10/11 (90,9%) | 7/10 (70,0%) | 6/11 (54,5%) | 9/11 (81,8%) | 0,0744 |
| D8 | 5/5 (100,0%) | 4/6 (66,7%) | 1/5 (20,0%) | 0/6 (0,0%) | 4/6 (66,7%) | 0,0046 |
| D9 | 5/5 (100,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/5 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 2/6 (33,3%) | 0,0001 |
| D10 | 5/5 (100,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/5 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | <0,0001 |
| D11 | 4/5 (80,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/5 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0,0005 |
| D12 | 3/5 (60,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/5 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0,0061 |
| D13 | 2/5 (40,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/5 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0,0529 |
| D14 | 0/5 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/5 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | 0/6 (0,0%) | - |

Teste Exato de Fisher. Fonte: autoria própria.

Com relação ao tamanho da ferida cirúrgica, na Tabela 2 observa-se que no tempo inicial não houve diferença significativa entre os grupos quanto à medida da ferida realizada ($p>0,05$), conferindo a esta a característica de padronização esperada neste período. Nota-se que na mensuração realizada nos animais eutanasiados aos 3 dias, não houve diferença dos grupos tratados (G2, G3, G4 e G5) com o grupo Controle (G1) e que apesar do grupo G5 ter apresentado medida de úlcera significativamente menor ($p<0,05$) que o G3, ambos os grupos exibiram medidas equiparada às apresentadas pelos demais grupos neste período. Aos 7 dias, todos os grupos apresentaram redução significativa da úlcera em relação ao 3º dia do procedimento, sendo que os grupos que utilizaram a TFBML (G4 e G5) foram os únicos que tiveram redução significativa em comparação ao G1 ($p<0,05$). Entretanto, tais grupos não diferiram estatisticamente dos demais grupos que utilizaram outras terapias. Após 14 dias, conforme esperado devido ao processo cicatricial fisiológico que ocorre na mucosa oral, todos os grupos apresentaram ausência de úlcera ($p>0,05$).

4.2.3.2 *Análise histomorfológica*

Embora tenha sido feita a análise de todas as secções histológicas obtidas, nos resultados apresentados, optou-se por remover uma secção histológica corada em HE dos grupos G2, G3 e G4 (todas referentes a 3 dias de sacrifício), e duas secções do grupo G2 (com 7 dias) por falta de material biológico em boas condições para avaliação.

No que se refere aos parâmetros morfológicos na fase inicial do reparo tecidual (Tabela 3), observou-se que com relação ao edema, apenas o grupo G4 apresentou maior parte das secções (75%) com ausência da variável no período de 3 dias da realização do procedimento cirúrgico, fato este observado nos demais grupos somente após 7 dias. Neste período, o G2 foi o único que apresentou todas as secções (100%) com ausência de edema. Com 14 dias, como esperado, este parâmetro não foi observado nos grupos experimentais.

Sobre a expressão de células inflamatórias, no 3º dia, o único grupo que apresentou parte das secções (50%) com ausência do infiltrado inflamatório, foi o G4 e após 14 dias, os grupos G2, G4 e G5 apresentaram 60% das secções sem infiltrado evidente. O G3 apresentou secções ainda com infiltrado moderado (40%) ou discreto (20%) e o G1, 80% das secções com discreto infiltrado inflamatório persistente. Com relação ao tipo celular predominante, ao 3º dia, o único grupo que apresentou todas as secções com contingente superior de células monomorfonucleares foi o grupo Laser (G4), sendo o tipo celular encontrado nos demais grupos nesse período o polimorfonuclear. No 7º dia, entretanto, além do grupo G4, os grupos Extrato fluido (G2) e associação (G5) apresentaram predominância de células monomorfonucleares. Aos 14 dias, a maior parte de células inflamatórias era de característica monomorfonuclear em todos os grupos.

Tabela 2 - Média (desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) da medida em milímetros, inicial e final da úlcera, em função do grupo (LBO/UFBA, 2022).

| Medição | Grupo | Tempo (dias) | | | | | |
|---------|-------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| | | 3 dias | | 7 dias | | 14 dias | |
| | | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) |
| Inicial | G1 | 9,60 (0,89) Aa | 9,00 (9,00; 10,00) | 9,20 (0,84) Aa | 9,00 (8,00; 10,00) | 9,40 (1,14) Aa | 9,00 (9,00; 10,00) |
| | G2 | 10,40 (0,55) Aa | 10,00 (10,00; 11,00) | 9,60 (0,89) Aa | 9,00 (9,00; 10,00) | 9,17 (0,41) Aa | 9,00 (9,00; 9,00) |
| | G3 | 9,20 (0,45) Aa | 9,00 (9,00; 9,00) | 8,90 (0,55) Aa | 9,00 (9,00; 9,00) | 9,10 (0,22) Aa | 9,00 (9,00; 9,50) |
| | G4 | 9,40 (1,52) Aa | 9,00 (9,00; 9,00) | 9,00 (1,22) Aa | 9,00 (8,00; 9,00) | 9,83 (1,47) Aa | 9,50 (9,00; 11,00) |
| | G5 | 8,60 (0,55) Aa | 9,00 (8,00; 9,00) | 9,00 (0,71) Aa | 9,00 (9,00; 9,00) | 8,50 (1,22) Aa | 9,00 (7,00; 9,00) |
| Final | G1 | *7,10 (0,89) Aab | 7,00 (6,50; 8,00) | *5,60 (0,55) Ba | 6,00 (5,00; 6,00) | *0,00 (0,00) Ca | 0,00 (0,00; 0,00) |
| | G2 | *6,80 (0,45) Aab | 7,00 (7,00; 7,00) | *4,20 (2,49) Bab | 5,00 (4,00; 6,00) | *0,00 (0,00) Ca | 0,00 (0,00; 0,00) |
| | G3 | *8,00 (1,58) Aa | 8,00 (7,00; 9,00) | *4,10 (2,46) Bab | 4,50 (4,00; 6,00) | *0,00 (0,00) Ca | 0,00 (0,00; 0,00) |
| | G4 | *7,00 (1,87) Aab | 7,00 (6,00; 7,00) | *2,50 (2,35) Bb | 3,50 (0,00; 4,00) | *0,00 (0,00) Ca | 0,00 (0,00; 0,00) |
| | G5 | *6,60 (0,55) Ab | 7,00 (6,00; 7,00) | *2,60 (2,77) Bb | 2,00 (0,00; 5,50) | *0,00 (0,00) Ca | 0,00 (0,00; 0,00) |

*Difere significativamente do tempo inicial ($p \leq 0,05$). Letras distintas (maiúsculas comparando os tempos na horizontal e minúsculas comparando os grupos na vertical dentro de cada mediação) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). p (tempo) $<0,0001$; p (grupo) $=0,0443$; p (medição) $<0,0001$; p (tempo x grupo) $=0,3068$; p (medição x grupo) $=0,0489$; p (tempo x medição) $<0,0001$; p (tempo x grupo x medição) $=0,0134$. Análise realizada com modelo linear misto. Fonte: autoria própria

No tocante aos parâmetros referentes à fase proliferativa com o recrutamento e diferenciação de fibroblastos (celularidade) no tecido em reparo, notou-se que aos 3 dias, 100% das secções analisadas apresentaram discreto contingente de células povoando o microambiente tecidual, exceto no G4, que nesse período apresentou 25% das secções com celularidade classificada como moderada. Com 7 dias, entretanto, observou-se que apesar do G4 ter exibido 20% das secções com intensa celularidade, o grupo associação (G5) apresentou 60% das secções com população fibroblástica intensa. O G2 neste mesmo período, revelou 100% das secções com celularidade moderada. Contudo, aos 14 dias, todos os grupos que foram submetidos a algum tipo de terapêutica, apresentaram 20% das secções com discreta celularidade, e apenas o grupo Controle (G1) exibiu 60% das secções com celularidade moderada e 40% intensa (Tabela 3).

Com relação à deposição de fibras colágenas no leito do tecido em reparo, observou-se que os grupos G1, G2 e G3 não apresentaram características de início da fibroplasia aos 3 dias, visto que 100% das secções, esta encontrava-se ausente. Os grupos que receberam a TFBML (G4 e G5), apresentaram deposição colagênica no 3º dia, com uma discrepante diferença do grupo G4, que apresentou 50% das secções com intensa fibroplasia. No G5, a deposição esteve presente em apenas 20% das secções analisadas. Aos 14 dias, notou-se variação de moderada a intensa em todos os grupos investigados (Tabela 3).

Acerca da re-epitelização (Tabela 3), notou-se que apenas os grupos G1 e G4, apresentaram este processo já iniciado no período de 3 dias, com 40% das secções coradas em HE do G1 com re-epitelização completa, porém ainda desorganizada, 50% das secções do G4 re-epitelizadas com característica completa de organização, com presença de papilas formadas. Esta característica só foi observada nos demais grupos experimentais (G2, G3 e G5) a partir de 7 dias, exceto no grupo Controle (G1), onde ocorreu apenas 14 dias após realização do procedimento cirúrgico. Aos 14 dias, apenas o grupo G2 apresentou 100% das secções com a re-epitelização completa e organizada com presença de papilas linguais, o que equivaleu a 60% das secções nos grupos submetidos a TFBML (G4 e G5). Os grupos G1 e G3, apresentaram apenas 40% das secções com tais características nesse período.

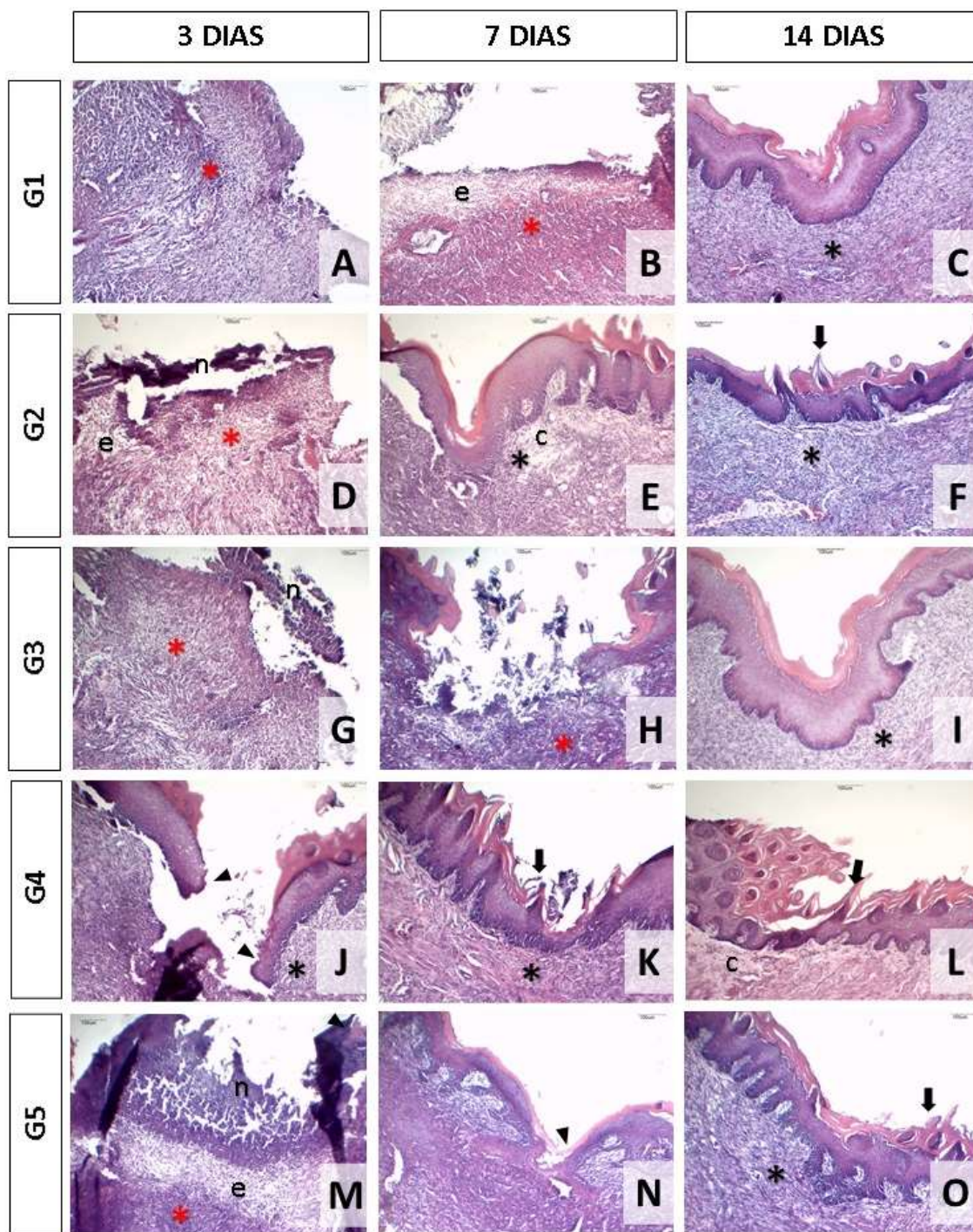
Tabela 3 – Distribuição de frequências dos resultados das análises morfológicas em função do grupo e tempo de sacrifício (LBO/UFBA, 2022).

| Variável | Resultado | G1 | | | G2 | | | G3 | | | G4 | | | G5 | | |
|------------------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 3 dias | 7 dias | 14 dias | 3 dias | 7 dias | 14 dias |
| | | n=5 | n=5 | n=5 | n=4 | n=3 | n=5 | n=4 | n=5 | n=5 | n=4 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 | n=5 |
| Edema | Ausente | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 5(100%) | 0(0,0%) | 3(100%) | 5(100%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 5(100%) | 3(75,0%) | 4(80,0%) | 5(100%) | 0(0,0%) | 4(80,0%) | 5(100%) |
| | Discreto | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 1(25,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) |
| | Moderado | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 1(25,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) |
| | Intenso | 5(100%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 4(100%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 3(75,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 4(80,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) |
| Infiltrado inflamatório | Ausente | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 2(66,6%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 2(50,0%) | 3(60,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) |
| | Discreto | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 4(80,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 2(40,0%) |
| | Moderado | 3(60,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 2(50,0%) | 1(33,3%) | 0(0,0%) | 2(50,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 1(25,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) |
| | Intenso | 2(40,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 2(50,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(50,0%) | 4(80,0%) | 0(0,0%) | 1(25,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 5(100%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) |
| Característica do infiltrado | Ausente | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(66,6%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 2(50,0%) | 3(60,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) |
| | PMN | 5 (100%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 4 (100%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 5 (100%) | 4(80,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 5(100%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) |
| | MMN | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 5 (100%) | 0(0,0%) | 1(33,3%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 2(40,0%) | 2(50,0%) | 2(40,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 2(40,0%) |
| Celularidade | Ausente | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) |
| | Discreto | 5(100%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 4(100%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 4(100%) | 3(60,0%) | 1(20,0%) | 3(75,0%) | 2(40,0%) | 1(20,0%) | 5(100%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) |
| | Moderado | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 3(100%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 2(40,0%) | 1(25,0%) | 2(40,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 2(40,0%) |
| | Intenso | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 2(40,0%) |
| Re-epitelização | Ausente | 3(60,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 3(75,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(50,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) |
| | Parcial | 0(0,0%) | 4(80,0%) | 0(0,0%) | 1(25,0%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(50,0%) | 2(20,0%) | 0(0,0%) | 2(50,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 1(20,0%) | 0(0,0%) |
| | CDes | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 1(33,3%) | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 1(20,0%) | 2(40,0%) |
| | COrg | 0(0,0%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 0(0,0%) | 2(66,6%) | 5(100%) | 0(0,0%) | 2(40,0%) | 2(40,0%) | 2(50,0%) | 2(40,0%) | 3(60,0%) | 0(0,0%) | 3(60,0%) | 3(60,0%) |

CDes: completa desorganizada; COrg: completa organizada; PMN: polimorfonuclear; MNN: monomorfonuclear. Fonte: autoria própria

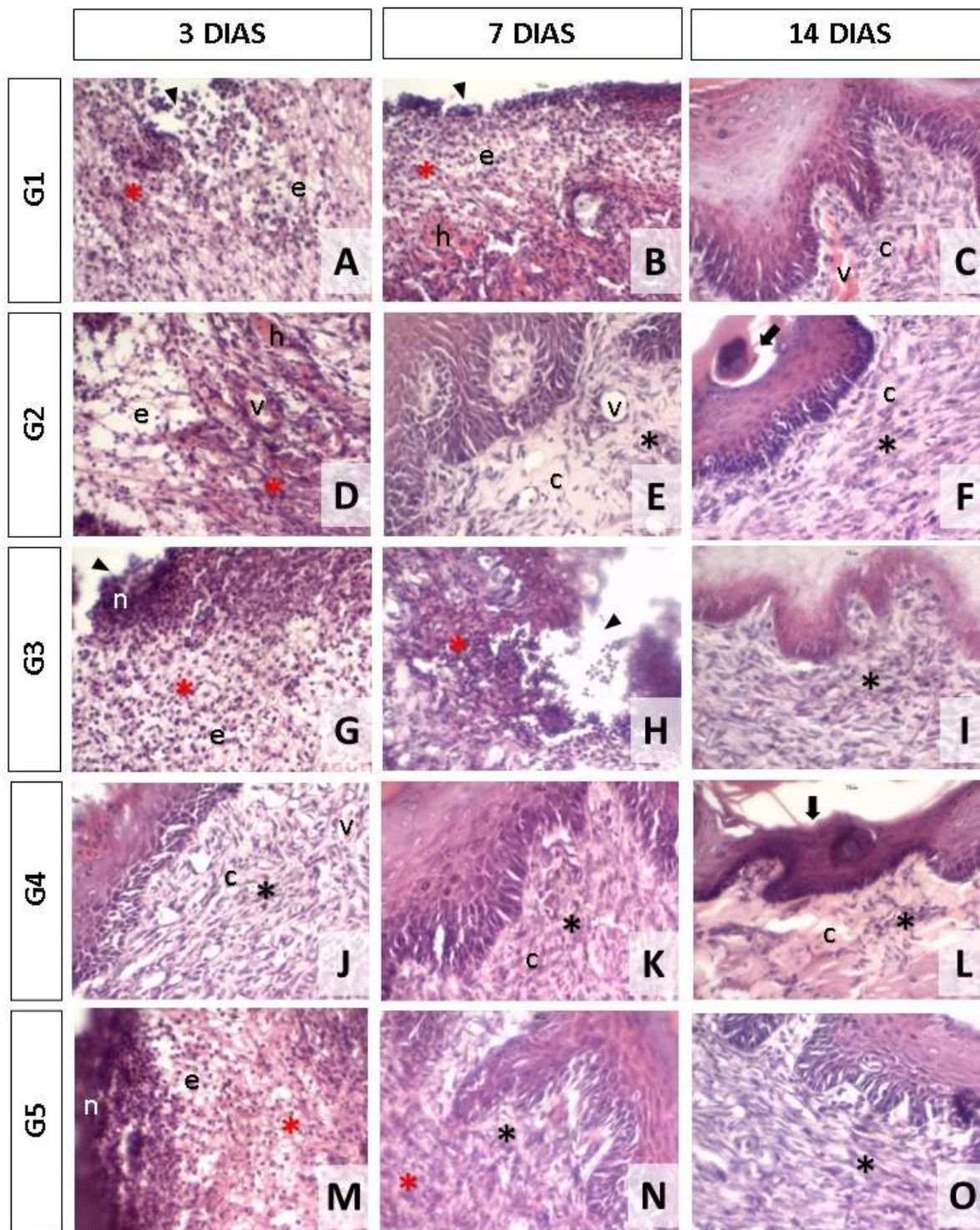
Os aspectos teciduais histológicos observados nos grupos avaliados encontram-se ilustrados nas Figuras 2 e 3.

Figura 2 - Fotomicrografias de secções histológicas (HE) na objetiva de 10x dos centros das úlceras, que demonstram os graus de re-epitelização dos grupos experimentais com 3, 7 e 14 dias. Observa-se que apenas o grupo G4 possuiu secções com re-epitelização parcial ainda no 3º dia (ponta da seta) e o grupo G5 exibiu formação inicial de epitélio em bordas da ferida (ponta da seta). Aos 7 dias, apenas os grupos G1 e G3 ainda exibiam presença de úlcera e persistência de infiltrado inflamatório (asterisco vermelho). Aos 14 dias, todos os grupos exibiram presença de fibroblastos (asterisco preto) e cobertura epitelial completa. Porém, os grupos G2 e G4, apresentaram também re-epitelização completa e organizada, com diferenciação das papilas linguais (seta). n: necrose. e: edema. c: matriz colagênica.



Fonte: LBO/UFBA, 2022.

Figura 3 - Fotomicrografias de secções histológicas (HE) na objetiva de 40x das úlceras, que ilustram as características histomorfológicas nos grupos experimentais com 3, 7 e 14 dias. Nota-se que aos 3 dias, o grupo G4 exibe presença de fibroblastos (asterisco preto) e início da síntese de colágeno (c), enquanto os demais grupos apresentam edema (e), infiltrado inflamatório (asterisco vermelho), áreas de necrose (n) e presença de úlceras (ponta da seta). Aos 7 dias, os grupos G2 e G4 apresentam re-epitelização, celularidade tecidual (asterisco preto) e matriz colagênica (c). Aos 14 dias, todos os grupos apresentaram ausência de úlcera e os grupos G2 e G4, com re-epitelização completa e organizada, com diferenciação das papilas linguais (seta). h: extravasamento de hemossiderina. cruz preta: luz de vaso sanguíneo.



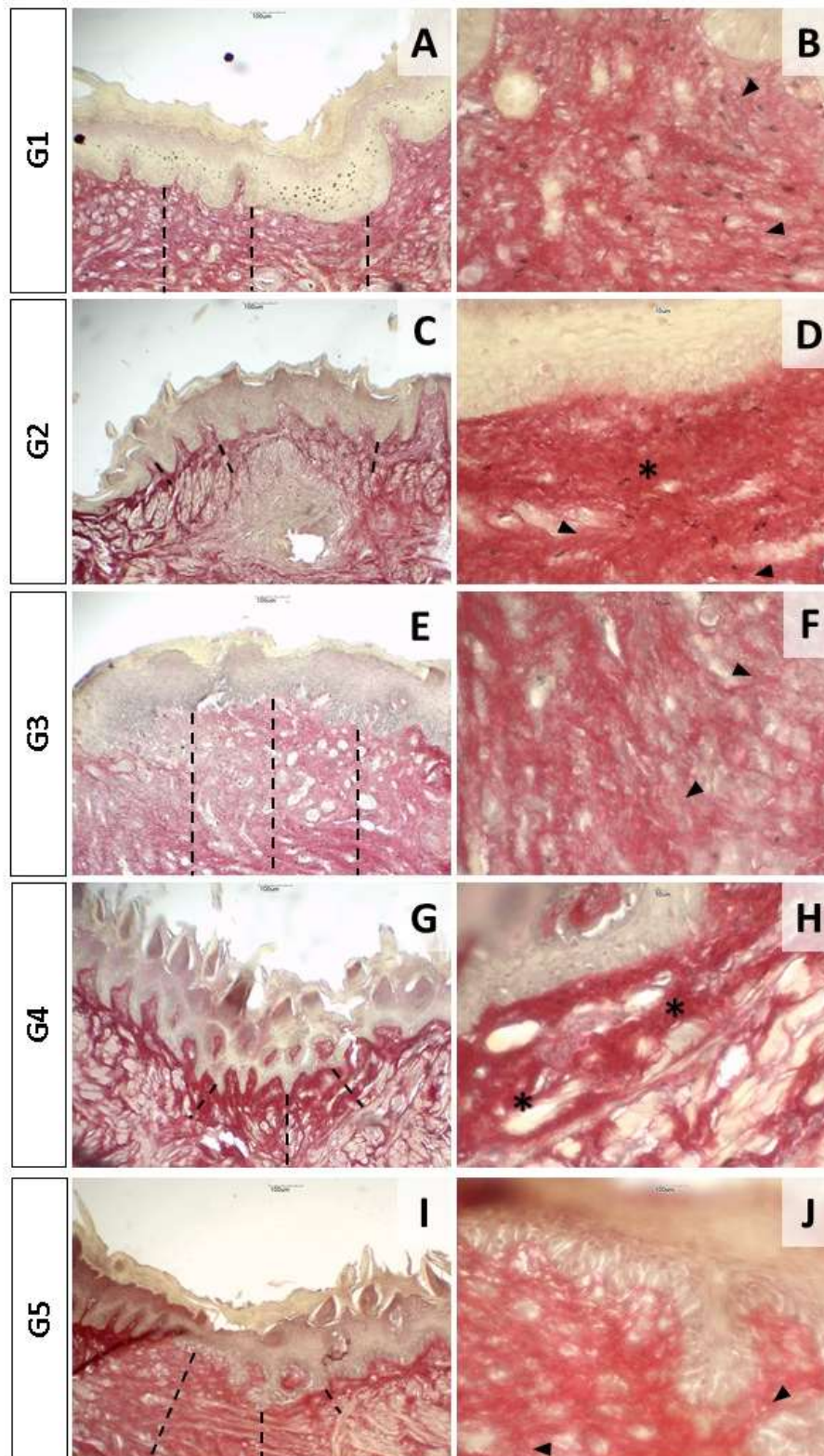
Fonte: LBO/UFBA, 2022.

Para execução da análise morfológica do padrão de deposição do colágeno total (Figura 4), optou-se por remover duas secções histológicas coradas em Sírius Vermelho do grupo G2, com 3 e 7 dias de sacrifício, e uma secção do G4, referente a um caso de 3 dias, devido à falta de boas condições de material para avaliação.

Observou-se que os grupos que utilizaram a infusão de camomila (G3 e G5) foram os que apresentaram características morfológicas que mais se aproximaram do aspecto de organização do colágeno presente no grupo Controle (G1), onde aos 3, 7 e 14 dias, havia predominância de fibras colágenas com alteração do padrão de normalidade e feixes fragmentados, de espessura delicada.

O grupo tratado com Extrato fluido (G2) apesar de ter exibido características similares ao grupo Controle (G1) no 3º dia, passou a apresentar um padrão mais amadurecido a partir do 7º dia, visto que metade das secções apresentavam feixes espessos e sem fragmentação, característica que se intensificou na análise tecidual do 14º dia, onde o padrão de deposição era predominantemente similar ao do tecido normal. O grupo tratado apenas com Laser (G4), se sobrepôs aos demais nessa análise, visto que aos 3 dias de reparo, os feixes tinham característica de padrão da normalidade, com fibras espessas e sem fragmentação (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografias representativas de seções histológicas (Sírius Vermelho) para ilustrar a expressão do colágeno com 14 dias nos grupos experimentais. HE, 10x (A, C, E, G, I) e 40x (B, D, F, H, J). Nota-se discreta diferença nos padrões morfológicos de deposição de colágeno (traços interrompidos), com variações de fibras mais delicadas (ponta de seta) a espessas (asterisco), o que interfere na intensidade da coloração utilizada e na resistência tênsil do tecido.



Fonte: LBO/UFBA, 2022.

4.2.3.3. Análise histomorfométricas

Pela análise do coeficiente de correlação intraclasse, a reprodutibilidade inter avaliador foi excelente ($CCI \geq 0,75$). Quanto às medidas morfométricas (Tabela 4) pode-se observar que houve aumento significativo nas medidas de ceratina (ECC), após 7 dias em relação aos 3 dias ($p < 0,05$) em todos os grupos que utilizaram algum tipo de terapêutica, a exceção do grupo Controle (G1). Ainda aos 3 dias, os grupos G4 e G5 apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) da ECC em relação ao G1, entretanto, o grupo G5 teve resultado similar aos demais ($p > 0,05$). Aos 7 dias, todos os grupos submetidos a algum tipo de terapêutica (G2, G3, G4 e G5), exibiram aumento significativo dessa camada, em comparação ao grupo Controle (G1). Contudo, todos os grupos alcançam padrões similares de espessura dessa camada aos 14 dias.

Na mensuração da DCBSE, aos 3 dias, todos os grupos investigados apresentaram similaridade na espessura de camada epitelial neoformada. Passados os primeiros 7 dias, houve aumento significativo das mensurações ($p < 0,05$) dos grupos tratados em comparação ao grupo Controle (G1), sendo os valores dos grupos que receberam tratamento com o infuso de camomila (G3 e G5) superiores em relação aos demais. No 14º dia foi encontrada menor medida nos grupos G2 e G5 em comparação com o G1, sendo o valor dos grupos G3 e G4 estatisticamente similares a este grupo (G1) (Tabela 4).

Para a avaliação quantitativa do percentual da área do colágeno, as secções coradas em Sírius Vermelho foram avaliadas por dois examinadores de forma cega, cuja análise entre avaliadores da correlação intraclasse foi considerada satisfatória ($CCI=0,59$).

Na Tabela 5 e Figura 5, observa-se que aos 3 dias, apenas o grupo G5, apresentou expressão de percentual de colágeno inferior ao grupo Controle (G1) e demais grupos tratados ($p < 0,05$). No 7º dia, o mesmo padrão foi encontrado nos grupos G2 e G4 em relação ao G1, contudo, aos 14 dias, todos os grupos apresentaram percentual de expressão colagênica similar ($p > 0,05$). No G3, o padrão de deposição se manteve constante ao longo do período investigado, fato diferente observado no G2, que apresentou menor percentual de expressão nos dias 3 e 7, com posterior aumento no 14º dia.

Tabela 4 -Média (desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) das medidas morfométricas lineares em função do grupo e do tempo (LBO/UFBA, 2022).

| Variável | Grupo | Tempo (dias) | | | | | |
|----------|-------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| | | 3 | | 7 | | 14 | |
| | | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) |
| ECC | G1 | 21,42 (10,64) Bb | 19,83 (15,62; 24,41) | 29,30 (10,70) Bc | 29,49 (21,61; 33,01) | 65,24 (15,79) Aa | 70,36 (50,83; 71,96) |
| | G2 | 25,38 (4,91) Bb | 24,11 (21,54; 29,22) | 73,02 (17,27) Aa | 63,32 (62,79; 92,96) | 55,09 (27,19) Aa | 47,66 (32,98; 68,55) |
| | G3 | 21,00 (8,13) Bb | 18,91 (14,99; 23,96) | 48,99 (17,70) Aab | 41,34 (38,90; 59,08) | 54,45 (19,61) Aa | 48,53 (41,43; 60,80) |
| | G4 | 40,85 (24,36) Ba | 36,67 (20,96; 60,74) | 68,23 (15,44) Aab | 69,82 (63,19; 71,05) | 57,12 (15,79) ABa | 59,50 (53,34; 62,32) |
| | G5 | 29,75 (11,58) Bab | 23,01 (21,63; 39,79) | 48,34 (17,67) Ab | 55,92 (43,71; 60,58) | 56,05 (16,75) Aa | 57,69 (37,05; 69,83) |
| DCBCSE | G1 | *106,54 (28,78) ABa | 107,32 (84,20; 125,45) | *98,96 (17,21) Bb | 99,27 (83,81; 115,84) | *140,69 (44,60) Aa | 131,58 (104,11; 179,97) |
| | G2 | *93,72 (7,57) Aa | 94,63 (88,71; 98,73) | 113,68 (37,89) Aab | 92,16 (91,47; 157,43) | *84,90 (26,76) Ac | 73,48 (69,64; 102,65) |
| | G3 | *97,62 (12,26) Ba | 98,10 (92,68; 107,19) | *146,67 (83,58) Aa | 107,58 (100,90; 192,43) | *126,81 (31,63) ABab | 130,19 (100,81; 143,23) |
| | G4 | *99,65 (19,29) Aa | 106,82 (88,33; 110,97) | *128,43 (72,30) Aab | 105,16 (90,87; 117,27) | *120,40 (30,62) Aab | 120,87 (102,77; 151,09) |
| | G5 | *85,03 (16,98) Ba | 88,49 (70,11; 92,18) | *140,62 (20,30) Aa | 135,50 (131,38; 137,52) | *98,54 (14,99) ABbc | 95,40 (89,38; 100,89) |

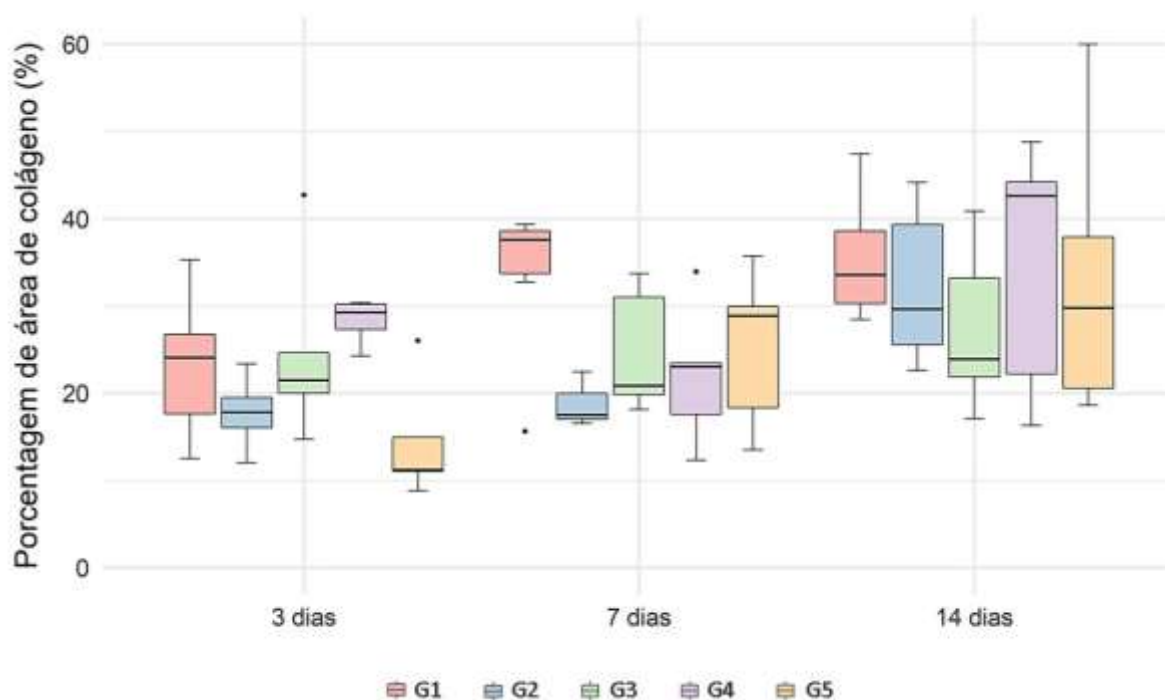
DCBCSE: Distância da camada basal a camada da superfície epitelial; ECC: espessura da camada córnea. *Difere da espessura de ceratina nas mesmas condições de grupo e tempo ($p \leq 0,05$). Letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). $p(\text{grupo})=0,0003$; $p(\text{ceratina})<0,0001$; $p(\text{tempo})<0,0001$; $p(\text{grupo} \times \text{ceratina})<0,0001$; $p(\text{grupo} \times \text{tempo})<0,0001$; $p(\text{ceratina} \times \text{tempo})<0,0001$; $p(\text{grupo} \times \text{ceratina} \times \text{tempo})=0,0053$. Análise realizada com modelos lineares. Fonte: autoria própria.

Tabela 5 - Média (desvio padrão), mediana (intervalo interquartil) da porcentagem de área de colágeno em função do grupo e do tempo (LBO/UFBA, 2022).

| Grupo | Tempo (dias) | | | | | |
|-------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------------------|
| | 3 | | 7 | | 14 | |
| | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) | Média (desvio padrão) | Mediana (intervalo interquartil) |
| G1 | 23,17 (8,17) Ba | 24,06 (16,05; 26,07) | 33,56 (9,11) ABa | 37,54 (32,74; 38,59) | 35,39 (7,18) Aa | 33,53 (29,45; 40,01) |
| G2 | 17,74 (4,63) Bab | 17,79 (14,71; 20,77) | 18,83 (3,18) Bb | 17,50 (16,53; 22,45) | 32,12 (8,98) Aa | 29,62 (25,19; 41,57) |
| G3 | 24,70 (10,68) Aa | 21,46 (20,01; 24,63) | 24,68 (7,12) Aab | 20,82 (19,83; 30,98) | 27,36 (9,53) Aa | 23,89 (21,85; 33,15) |
| G4 | 28,26 (2,82) ABa | 29,22 (26,29; 30,24) | 22,03 (8,04) Bb | 23,00 (17,55; 23,42) | 34,81 (14,53) Aa | 42,58 (22,22; 44,18) |
| G5 | 14,39 (6,85) Bb | 11,18 (11,03; 14,94) | 25,26 (9,07) Aab | 28,86 (18,33; 29,93) | 32,68 (15,69) Aa | 29,74 (19,11; 38,92) |

Letras distintas (maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). $p(\text{grupo})=0,0444$; $p(\text{tempo}) < 0,0001$; $p(\text{interação})=0,0906$. Análise realizada com modelos lineares. Fonte: autoria própria.

Figura 5 - Box plot da porcentagem de área de colágeno em função do grupo e do tempo (LBO/UFBA, 2022).



Fonte: autoria própria.

4.2.4 Discussão

Diante dos inúmeros estudos acerca do uso tópico da camomila²⁸⁻³⁰ e da TFBML^{3,31-33} isoladamente no reparo tecidual, inclusive no manejo de afecções orais como úlceras traumáticas²⁷, ulcerações aftosas recorrentes¹⁰ e MO^{16,92}, esta pesquisa visou fortalecer os achados da literatura frente a essas terapias e verificar qual modalidade, dentre as investigadas, modulou positivamente o processo de reparo.

As fases que caracterizam os eventos celulares e bioquímicos presentes no reparo tecidual se sobrepõem ao longo do tempo e não se excluem mutuamente⁴⁵. Apesar das úlceras já não estarem presentes nos grupos experimentais no 14º dia de investigação clínica, como previsto pela sequência dos eventos desencadeados para resolução do dano tecidual, a completa re-epitelização foi percebida em alguns animais de maneira precoce nos grupos que receberam algum tipo de intervenção terapêutica, comparando-se ao grupo Controle, nos dias 8, 9 e 10. Isto sugere que, sob a perspectiva clínica, o uso tópico da camomila, independentemente da formulação testada e do laser de maneira isolada ou combinada antecipou o fechamento da ferida cirúrgica.

No presente trabalho, a redução do tamanho das úlceras foi significativa no 7º dia de cicatrização nos grupos que utilizaram a TFBML (G4 e G5). De modo similar, Wagner et al.³ avaliaram o uso da TFBML 1, 5, 10 e 14 dias após procedimento cirúrgico com *punch* de 3 mm em dorso de língua de ratos *Wistar* e revelaram, na análise clínica, diminuição da área média da ferida em todos os grupos: controle (0 J/cm²), Laser 4 J/cm² e Laser 20 J/cm² ainda no 5º dia, porém, com menor área identificada no grupo Laser 4 J/cm². No 10º dia, todos os animais do grupo Laser 4 J/cm², apresentavam lesões totalmente reparadas, fato observado nos demais grupos apenas no 14º dia. Apesar do presente estudo ter utilizado fluência de 35 J/cm², aspectos clínicos e histológicos benéficos relacionados ao reparo tecidual foram observados, visto que embora todos os grupos apresentassem redução da ferida oral do 3º ao 7º dia, apenas os grupos submetidos à aplicação do laser exibiram melhores resultados que o grupo Controle aos 7 dias. Dessa forma, sob a perspectiva clínica, pode-se inferir que a TFBML foi a modalidade terapêutica que trouxe maior benefício nesse aspecto.

De modo semelhante aos autores supracitados³, o estudo experimental com cicatrização de úlceras mecanicamente induzidas em dorso de língua de ratos, de Farias Gabriel et al.¹²⁵, avaliou o efeito da TFBML na acetilação da histona 3 (acH3), que ativa genes de transcrição, bem como a expressão do fator de transcrição NF-κB, o qual é parte fundamental da resposta do processo inflamatório e desempenha um papel importante na defesa imunológica. Os autores utilizaram como protocolo a irradiação com laser InGaAlP, 660 nm, 40 mW, tamanho de ponto de 0,04 cm², 4 J/cm², 4 segundos e 0,16 J por ponto, uma vez ao dia em contato próximo por 10 dias consecutivos. A análise imuno-histoquímica com 3, 5 e 10 dias de experimento revelou que a TFBML acelera o reparo de úlceras pela ativação de mecanismos epigenéticos em estágios iniciais de cicatrização e ativa a migração epitelial e em fases tardias, estimula a diferenciação final das células epiteliais. Tais achados ajudam a explicar a repercussão clínica e características morfológicas encontradas na presente investigação, cujo grupo G4, que utilizou a TFBML, apresentou re-epitelização precoce em comparação aos demais grupos investigados. Ressalte-se que, apesar de utilizar-se o mesmo tipo de laser com semelhante comprimento de onda, os demais parâmetros do protocolo de irradiação divergiram entre os estudos.

Os achados obtidos na presente investigação se contrapõem com a revisão de Andrade, Clark, Ferreira⁸⁷, em relação à densidade de energia empregada, onde, segundo os autores, fluências compreendidas entre 3-6 J/cm² parecem ser mais eficazes do que aquelas acima de 10 J/cm² as quais estão associadas a efeitos deletérios. Entretanto, outro estudo experimental em ratos, executado por Rambo et al.²⁵, avaliou a expressão de biomarcadores inflamatórios

em um modelo de reparo cutâneo em ratos jovens e idosos irradiados com TFBML pelo método transcutâneo de ponto único, com energia total de 2 J, uma densidade de energia ainda superior a empregada no presente estudo, com fluência de 72 J/cm² e um tempo de 67 segundos. Os resultados mostraram que a TFBML foi eficaz no tratamento de feridas cutâneas tanto em animais jovens como idosos durante as diferentes fases do reparo tecidual. Estes resultados fundamentam a escolha dos parâmetros de fluência de 35J/cm² e de energia de 1J utilizados na presente investigação, por exibirem alta densidade de energia, porém com valores baixos de joules entregues diretamente ao tecido. Segundo Andrade, Clark, Ferreira⁸⁷, comprimentos de onda compreendidos entre 632,8 e 1000nm apresentam resultados mais satisfatórios no processo de cicatrização tecidual. Esses parâmetros conferem à TFBML a capacidade de promover seus principais efeitos fisiológicos como a resolução anti-inflamatória, neoangiogênese, proliferação epitelial e de fibroblastos, síntese e deposição de colágeno, revascularização e contração da ferida.

Tal informação corrobora com os achados de Machado, Vianna, Sbruzzi¹²⁶, ao avaliar os efeitos da TFBML em úlceras de pressão (UP) em humanos, por meio de uma revisão sistemática de estudos randomizados que utilizaram essa modalidade terapêutica sob diferentes protocolos. Os resultados dos autores apontam que comprimentos de onda superiores a 658 nm não parecem ser benéficos no tratamento das UP. Entretanto, na presente investigação, o laser diodo (AsGaAl) com comprimento de onda de 660 nm, em emissão contínua, com potência de 100mW energia de 1J e fluência de 35 J/cm² foi utilizado e pode-se observar seus efeitos benéficos sobre a cicatrização em mucosa oral de ratos.

Dessa forma, surge o questionamento que: apesar dos parâmetros clínicos indicarem que a TFBML foi a mais efetiva na indução do reparo, se ao final dos 14 dias, todas as demais terapêuticas levaram a total re-epitelização da ferida, a indicação do uso do laser ainda deve ser a mais recomendada? Soma-se a isso fatores que não podem ser desconsiderados, a exemplo de custo, acesso e adesão ao tratamento e praticidade. Independente desses fatores citados, os aspectos envolvidos na análise microscópica podem auxiliar a elucidar os reais fenômenos que ocorreram no microambiente do tecido lesionado e dessa forma contribuir para a escolha da modalidade terapêutica mais efetiva.

Com relação ao uso da *M. recutita*, diversos são os achados na literatura acerca dos efeitos benéficos desta planta medicinal sobre o reparo tecidual^{9,41,70}. A exemplo do estudo experimental conduzido por Nayak, Raju, Rao⁷² onde o ferimento cutâneo no dorso de ratos foi tratado com o extrato de *M. recutita*, em uma dose de 120mg/kg diariamente por via oral durante 14 dias (grupo teste), enquanto outros animais receberam apenas água (grupo

controle). Os autores observaram uma taxa de re-epitelização mais rápida no grupo teste (15,20 dias \pm 0,13) em comparação ao grupo controle (18,0 dias \pm 0,10), sendo a redução na área da ferida no grupo teste, estatisticamente significativa ($p < 0,002$). Apesar do referido trabalho ter sido conduzido em tecido cutâneo e a presente investigação em mucosa oral de ratos, tais achados podem contribuir para o melhor entendimento do reparo sob ação desta substância.

O extrato fluido da camomila têm sido grande alvo de investigações, ao exemplo do estudo realizado por Pavesi et al.⁴¹ que analisaram clínica e histologicamente a cicatrização de úlceras de MO induzidas em mucosa de hamsters. Em todos os períodos investigados (dias 0, 2, 5, 8, 10, 12, 14 e 16), o extrato fluido de camomila (Ad-Muc®) se mostrou superior ($p < 0,0001$) ao grupo tratado com corticosteróide (Celestone®) e ao grupo sem tratamento (Controle). Segundo os autores, nos dias 8, 10, 12 e 14 do experimento, os grupos controle e corticosteróide apresentaram aspectos histológicos severos de inflamação aguda ($p < 0,0001$) em relação ao grupo tratado com camomila, com extensas áreas de úlcera, sangramento, severa hiperemia e edema, e com presença de infiltrado inflamatório difuso. O grupo camomila entretanto, apresentou reação histopatológica menos intensa, com discreta hiperemia vascular e infiltrado inflamatório, além da ausência de úlceras.

Em outro estudo experimental com ratos *Wistar*, Oliveira et al.⁹, também compararam o uso tópico do extrato fluido de camomila (Ad-muc®) a um corticosteróide, a triamcinolona (Omcilon-A). Oliveira et al.⁹ objetivaram avaliar a influência do TNF- α e da apoptose em ratos com Diabetes mellitus (DM). Para tal, animais diabéticos e normoglicêmicos foram submetidos à realização de úlcera em mucosa jugal por abrasão. Os animais foram avaliados clinicamente e tiveram sangue coletado no dia zero e nos dias 5 e 10. Os autores concluíram que o extrato de camomila pôde otimizar a cicatrização de úlceras orais traumáticas em ratos diabéticos através da redução da apoptose no epitélio e expressão de TNF- α . Apesar de no presente trabalho os animais não cursarem com possíveis distúrbios sistêmicos capazes de influenciar no processo de reparo tecidual, entende-se que a investigação de citocinas, como o TNF- α , parece ser um dos caminhos que precisam ser melhor esclarecidos acerca do mecanismo de ação da camomila na cicatrização.

Contudo, no presente estudo foi investigada não apenas o extrato fluido (G2) como também a infusão da mesma (G3) para uso tópico, no intuito de simular o bochecho com o chá desta planta medicinal. Isto porque o uso da infusão de camomila torna-se mais viável devido ao baixo custo, maior acessibilidade e aplicabilidade em casos de úlceras extensas ou múltiplos sítios de acometimento da mucosa de revestimento oral, como ocorre nos casos de

MO. Entretanto, nas secções histológicas observadas, notou-se que o extrato fluido foi mais efetivo tanto no controle dos fenômenos exsudativos como no estímulo aos proliferativos, uma vez que aos 7 dias de sacrifício, os animais deste grupo (G2) apresentaram em sua maioria ausência de edema e infiltrado inflamatório, em contrapartida, no mesmo período apresentaram ainda celularidade moderada. Uma possível justificativa para tais achados pode estar associada à concentração obtida da substância, às características específicas que envolvem o uso da pomada, orabase, como descrito pelos achados de Chaushu et al.¹²⁷.

Apesar do uso tópico da *M. recutita* ser comum, sua eficácia clínica depende de múltiplos fatores⁷, como o tipo de camomila, a forma como a planta foi cultivada, manipulada e processada^{41,44,70,71} a concentração, veículo utilizado, forma, frequência e duração da aplicação bem como da característica da lesão envolvida^{7,41}. Dessa forma, o fabricante do chá de camomila selecionado, assim como o método empregado para tentativa de simulação do bochecho nos animais através do uso de conta gotas, pode ter influenciado na ação do infuso da planta nos grupos G3 e G5, embora todos os cuidados fossem tomados em relação a quantidade e o tempo do líquido na boca dos animais.

Ao serem investigadas as características macroscópicas e microscópicas e efeitos do gel orabase sozinho na cicatrização primária dos tecidos moles, em mucosa oral de ratos, através da expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais e epiteliais, Chaushu et al.¹²⁷ observaram que a orabase promove o fechamento de lacunas epiteliais e dessa forma, é capaz de acelerar o reparo tecidual em uma cicatrização primária de feridas. A nível molecular, a orabase exerce seu efeito através da promoção da diferenciação epitelial de células-tronco. Ademais, apesar dos autores terem testado apenas a pomada como veículo, sem o emprego de constituinte bioativo propriamente dito, extrapola-se que a característica pegajosa que a orabase possui, permite o maior tempo de contato e consequentemente maior ação terapêutica de possíveis agentes como a *M. recutita* presente no extrato fluido comercializado.

Apesar das evidências^{7,41} acerca da ação da camomila sob formulação de extrato fluido (Ad-muc®) sobre o tecido em reparo, é de se considerar a necessidade de investigações de outras formulações desta planta menos onerosas e mais acessíveis à população em geral. Com este intuito, dos Reis et al.²⁸ avaliaram a potencial eficácia e a viabilidade da crioterapia feita com infusão de camomila para prevenção e redução da intensidade da MO em pacientes recebendo 5-fluorouracil e leucovorina para tratamento de câncer gástrico ou colorretal. Houve uma incidência de 30% de MO no grupo camomila e nenhum desses pacientes desenvolveu grau 2 ou superior, enquanto no grupo controle, a incidência foi de 50% e sete

desses pacientes desenvolveram MO grau 3. Apesar das metodologias distintas, as secções histológicas analisadas na presente investigação, em contraste com o estudo de dos Reis et al.²⁸, indicam que o grupo Infusão de camomila (G3) não apresentou diferença dos parâmetros morfológicos inflamatórios encontrados ao longo do tempo, quando comparado ao grupo Controle (G1).

A despeito dos constituintes bioativos que compõem plantas medicinais como os flavonóides, cumarinas, terpenos e esteróides, possuem a capacidade de promover a proliferação de queratinócitos e fibroblastos, além de exibirem efeitos anti-inflamatórios, antimicrobianos e antioxidantes¹²⁸, Duarte, Quirino, Patrocínio, Anbinder⁴⁴, não encontraram diferenças em relação ao grau de inflamação entre o grupo controle e aqueles tratados com a *M. recutita*. Os referidos autores utilizaram 36 ratos *Wistar*, submetidos a úlceras no centro da língua com *punch* de 5 mm. Os animais foram alocados em um grupo controle, que não recebeu tratamento, e um grupo teste, onde foi aplicado a partir do 1º dia da realização da ferida, 0,02 mL de extrato fluido de camomila (Ad-muc®) de 12 em 12 horas, conforme orientação do fabricante. A análise clínica e histomorfológica das secções obtidas nos períodos de 3, 7 e 10 dias, revelou que os principais efeitos encontrados estavam relacionados ao período experimental em si e não ao tratamento instituído. Contudo, notaram que os fibroblastos foram dispostos de forma mais desorganizada nas amostras do grupo controle em comparação ao grupo teste e a diferenciação das papilas linguais também foi mais pronunciada nas amostras dos animais tratados e aos 10 dias maior re-epitelização foi percebida no grupo teste.

Dessa forma, os efeitos mais significativos observados durante a análise histomorfológica e clínica da área de re-epitelização, segundo os autores⁴⁴, não foram influenciados pela terapia empregada e sim pelo tempo fisiológico do reparo em si. Este achado reforça os resultados da análise histomorfológica do presente experimento, onde a re-epitelização foi completa em todos os grupos experimentais no 14º dia. Entretanto, grupos submetidos a aplicação tópica da *M. recutita*, independentemente da formulação (G2, G3 e G5) revelarem que a re-epitelização se iniciou logo no 3º dia do reparo, enquanto o grupo Controle (G1) exibiu com 7 dias, 80% das secções, ainda com re-epitelização em estágio parcial, corroborando com as características observadas na avaliação clínica. Contudo, o único grupo experimental que apresentou todas as secções histológicas com total re-epitelização de forma organizada e com presença de diferenciação de papilas linguais aos 14 dias, foi o grupo do Extrato fluido da camomila (G2). O que sugere que esta modalidade terapêutica foi superior que as demais para a re-epitelização do dorso de língua de ratos.

O estudo *in vitro* de Wyganowska-Swiatkowska et al.¹²⁹ analisou a influência da clorexidina (CHX), do óleo essencial (OE: timol, 0,064%; eucaliptol, 0,092%; salicilato de metilo, 0,060%; mentol, 0,042%) como enxaguante bucal e de infusões de sálvia, camomila e calêndula sobre cultura de fibroblastos humanos. Após 24 e 48 horas, os autores, avaliaram a morfologia celular, o crescimento relativo e a apoptose dessas células e verificaram que a CHX, o OE e a sálvia reduziram a taxa de proliferação de fibroblastos e estimularam morte celular. A exposição de células a infusões de camomila ou calêndula não alterou a morfologia ou proliferação dos fibroblastos. Os resultados mostraram que a infusão de camomila não influenciou negativamente a biologia desse tipo celular. No presente estudo, aos 14 dias da realização do ferimento, os grupos experimentais apresentaram padrão de celularidade equiparados, o que reforça os achados de Wyganowska-Swiatkowska et al.¹²⁹ acerca do infuso da camomila.

Ainda, percebeu-se que dentre os três grupos que utilizaram a *M. recutita* como terapêutica no presente experimento (G2, G3 e G5), o grupo que associou a camomila com a TFBML (G5) foi o que apresentou maior contingente de fibroblastos no 7º dia, com a celularidade tecidual variando de moderada a intensa. O grupo da Infusão (G3) foi caracterizado com a maior parte das secções (60%) ainda com discreta expressão desse contingente celular no mesmo período, sugerindo um atraso no processo esperado. Contudo, avaliando a expressão de colágeno presente no tecido nesse período da investigação, notou-se que este grupo (G3) se equiparou com o grupo da associação (G5).

Embora o tratamento com camomila não tenha apresentado efeito na contagem de fibroblastos em nenhum dos momentos considerados no estudo de Duarte, Quirino, Patrocínio, Anbinder⁴⁴, foi observado maior teor de colágeno em animais tratados com camomila após 10 dias de tratamento. A camomila apresentou maior influência na atividade de fibroblastos do que na contagem de células em si e os autores buscaram justificar este achado com o trabalho de Lim, Kim¹³⁰, que explica que alguns flavonóides, como a quercetina e a apigenina, que são constituintes bioativos da camomila, são conhecidos por inibir a matriz-metaloproteinase-1 (MMP-1) e regular negativamente a expressão de MMP-1 através da inibição da ativação da proteína ativadora-1 (AP-1). Logo, o aumento do nível de colágeno pode resultar da inibição da atividade das metaloproteinases, o que aponta a necessidade de novos trabalhos para se elucidar os possíveis mecanismos relacionados a ação da *M. recutita* na atividade dos fibroblastos durante a síntese colagênica.

O tecido de granulação, formado através do aumento da proliferação fibroblástica, biossíntese colagênica e elástica¹³¹, começa a se formar aproximadamente quatro dias após o

estabelecimento da lesão⁴⁵. Nesta fase inicial, há predominância da síntese de colágeno tipo III, caracterizado com feixes de fibras delicadas depositadas de forma desorganizada que, posteriormente, são degradados e substituídos pela síntese de colágeno do tipo I, fenômeno orquestrado por fatores como o TGF- β 1 e FGF. Ademais, as novas fibras colágenas tornam-se mais espessas e orientadas em paralelismo que resulta em maior força tênsil tecidual⁴⁵.

Em seu estudo experimental, que avaliou seções de tecido obtidas de quatro grupos experimentais: com irradiação simulada, TFBML, sílica e a associação de ambos, nos períodos de 3, 7, 10, 15, 20, 30 e 60 dias, Medrado et al.²³ realizaram uma análise com microscopia de fluorescência e observaram que a birrefringência revelou uma organização, com fibras colágenas dispostas de forma paralela nos animais submetidos ao tratamento da TFBML nos dias 10, 15 e 20 após ferimento cutâneo. Revelou ainda aumento gradual de colágeno tipo I e fibronectina, especialmente proeminentes nos animais submetidos à contaminação por sílica e tratamento com laser. No entanto, a partir do 30º dia em diante, diferença foi menos aparente, uma vez que a substituição do tecido de colágeno de todos os grupos mostraram similarmente o mesmo grau avançado de maturação. Dessa forma, revelaram uma tendência de substituição precoce do colágeno tipo III pelo tipo I em animais tratados com laser. Este fato pode justificar a disposição das fibras de colágeno com alteração do padrão de normalidade em todas as seções dos grupos G1, bem como a espessura delicada com um padrão fragmentado das fibras no 3º dia do experimento no grupo Controle (G1) ao mesmo tempo em que o grupo Laser (G4) apresentou a maioria das seções com fibras colágenas espessas e sem fragmentação.

Segundo Medrado et al.²³, a microscopia imunofluorescente foi útil para demonstrar os tipos de colágeno (I e III), bem como fibronectina, dentro dos tecidos em cicatrização, visto que a diferença na interferência de cores nessa técnica, permite a diferenciação dessas fibras. Contudo, a análise realizada pelo presente trabalho limitou-se a utilização de seções coradas com Sírius Vermelho em microscopia de luz, como realizado previamente por Fortuna et al.¹¹⁷. Os autores¹¹⁷ também utilizaram seções coradas com Sírius Vermelho seu estudo experimental, para investigar os efeitos da terapia com laser GaAlAs de 670 nm na densidade vascular e fibroplasia durante a remodelação tecidual, através de uma análise quantitativa do percentual de colágeno depositado no tecido na fase tardia do reparo (14, 21, 28 e 35 dias). Encontraram expressão de colágeno significativamente maior no grupo laser comparado com o grupo controle nos dias 14 e 21 após a criação da ferida cutânea ($p = 0,008$; $p = 0,016$) e no grupo controle entre 14 e 28 e 14 e 35 dias ($p = 0,001$; $p = 0,007$), sugerindo que a TFBML teve influência na fase tardia do reparo. Apesar da fase de remodelamento se iniciar duas a

três semanas após o estabelecimento da ferida, esta pode durar por mais de um ano⁴⁵, o que sugere que os achados referentes a síntese colagênica no 14º dia, ainda sejam incipientes com relação a real expressão de colágeno que será sintetizada no tecido. Futuros estudos com um período de investigação a longo prazo, como os realizados pelos autores supracitados podem ser importantes para caracterizar melhor a fase do remodelamento tecidual.

Em sua revisão, Kuffler⁸⁵ afirmou que a cicatrização de feridas ocorre devido a uma competição no mecanismo entre a síntese e a degradação do colágeno. Portanto, segundo os autores, qualquer fator que aumente a degradação ou reduza a síntese de colágeno pode interferir no processo de cicatrização. Dessa forma, ressalta-se a importância em se conhecer o percentual total de colágeno, para melhor compreender o processo do reparo tecidual, como foi realizado no presente estudo através da análise morfométrica das secções coradas com Sírius Vermelho.

As características benéficas que envolvem a TFBML no processo de reparo tecidual por estimulação de reações celulares como migração, proliferação, apoptose e diferenciação celular¹³², além de modular a secreção de fatores de crescimento, como o VEGF e o FGF¹³³, criam a expectativa que os grupos que envolvem esta terapêutica, tenham efeito superior às demais modalidades. No presente trabalho, de fato, a análise morfológica tecidual revelou que, de maneira geral, o grupo Laser (G4) foi o grupo terapêutico que apresentou menor tempo para resolução da fase inflamatória do reparo, visto que aos 3 dias, após a realização do ferimento cirúrgico padronizado, a maior parte das secções não evidenciavam edema, metade delas não apresentava mais presença de infiltrado inflamatório e 40% delas, aos 7 dias já não exibiam sinais de hiperemia. De igual modo, ainda no 3º dia, esse grupo apresentava secções com característica de celularidade moderada a intensa e expressão de colágeno no microambiente da lesão em reparo. Ademais, neste período do reparo, o G4 apresentava todos os cortes histológicos com algum grau de epitelização superficial. Contudo, quando esta terapêutica foi associada ao uso tópico da infusão de camomila (G5), as secções não apresentaram padrão semelhante ou superior a TFBML ou a infusão de camomila de maneira isolada.

Segundo de Paiva et al.¹³⁴, na prática clínica, muitas vezes é comum e até necessário a combinação de dois ou mais agentes terapêuticos em um esforço para maximizar os efeitos desejados durante o tratamento. Dessa forma, uma maior compreensão do agente terapêutico mais eficaz ou da combinação de modalidades para uma determinada condição é necessária para otimizar a tomada de decisão clínica. Esse estudo contribui para a literatura vigente,

trazendo resultados pioneiros no que se refere a associação da TFBML e da infusão de camomila, resfriada.

Naturalmente, a associação da TFBML com outras modalidades terapêuticas já foi investigada na literatura. No ECR, de Paiva et al.¹³⁴, TFBML com laser superpulsado de 905 nm em combinação com diodos emissores de luz (LED) de 875 e 640 nm e crioterapia por compressas de gelo de borracha flexível como um único ou combinado na recuperação do músculo esquelético após contrações excêntricas dos extensores do joelho. Como parâmetros os autores avaliaram o desempenho do exercício avaliando a contração voluntária máxima, o início tardio da dor muscular e dano muscular pela presença de creatina quinase. Segundo os autores, a TFBML isolada mostrou-se ideal para recuperação pós-exercício com melhora dos parâmetros ($p < 0,05$) de 24 a 96 horas em comparação com placebo, crioterapia e crioterapia combinada a TFBML. Apesar de tratar-se de um estudo com finalidade e metodologia distinta e ainda ser específica para outra área do conhecimento da saúde, a inclusão destes autores nesta discussão enriquece a compreensão geral sobre o uso de terapêuticas combinadas, em especial a TFBML, que de igual modo aos achados do presente estudo, também apontam que tal terapia quando empregada de maneira isolada se mostra superior à associação com outra modalidade.

Sobre o uso tópico da *M. recutita*, a formulação que mostrou melhor resultado na análise histológica com controle da inflamação e fechamento precoce da ferida cirúrgica, foi o extrato fluido (G2), uma vez que ao comparando ao uso da infusão de camomila (G3) ou associação da infusão com a TFBML (G5), a resolução do edema, do infiltrado inflamatório e a completa re-epitelização foram antecipadas em comparação ao grupo Controle (G1) com o uso desta terapêutica. Contudo, notou-se que acerca dos parâmetros relacionados à celularidade e deposição de colágeno, correspondentes ao início da fase proliferativa do reparo e, ainda, considerando a análise clínica, o grupo da associação (G5) mostrou superioridade em relação aos demais grupos que utilizaram esta planta medicinal no 3º e 7º dias, fato que pode estar atribuído a ação bioestimuladora da TFBML e não necessariamente a ação do infuso em si.

Com intuito de reduzir a quantidade de ratos utilizados no presente trabalho, sem comprometer a qualidade dos resultados, o número mínimo de animais do cálculo amostral foi utilizado, totalizando grupos de cinco. Entretanto, a perda amostral que ocorreu em alguns grupos, limitou a análise estatística dos aspectos morfológicos investigados, visto que muitas variáveis foram avaliadas, viabilizando apenas a análise descritiva desses dados.

A partir da discussão apresentada, percebe-se que apesar de tanto a TFBML de maneira isolada ou em conjunto com a infusão de camomila resultarem na antecipação da redução clínica da ferida do dorso de língua dos animais, os parâmetros histológicos demonstraram ação benéfica do uso da *M. recutita*, sob formulação de extrato fluido, através do controle da fase exsudativa da inflamação e do estímulo durante a fase proliferativa, ambos no 7º dia após realização do ferimento. Porém, a TFBML permanece sendo um potente modulador do reparo, visto que o uso desta terapia, mostrou mais eficiência em comparação ao uso do agente natural, uma vez que a resolução da fase inflamatória aguda foi percebida ainda no 3º dia do reparo tecidual. Histologicamente, o uso da associação destes agentes, entretanto, não foi superior ao uso dos mesmos de maneira isolada.

Sabe-se que para a consolidação dos resultados encontrados, a realização de outros estudos como ensaios clínicos randomizados e uso de outras tecnologias para análise das amostras teciduais, como a imuno-histoquímica, microscopia de fluorescência e eletrônica de transmissão, métodos amplamente descritos na literatura vigente acerca do reparo tecidual^{23,42,117} são importantes. Contudo, as análises clínica, morfológica e morfométrica obtidas, permitiram iniciar a investigação acerca dessas modalidades terapêuticas propostas.

4.2.5 Conclusão

Todas as modalidades terapêuticas propostas, atuaram de forma a modular positivamente diferentes etapas do reparo, uma vez que nenhuma delas promoveu o retardo do processo cicatricial em dorso de língua de ratos, reafirmando que a *M. recutita* possui efetiva ação sobre o reparo. A terapia com camomila sob extrato fluido e a TFBML isoladas, exibiram melhores padrões histológicos de reparo tecidual, quando comparados ao infuso ou à associação das terapias. Com relação à organização e ao quantitativo de deposição de colágeno tecidual, notou-se que os grupos tratados com TFBML apresentaram fibras colagênicas mais espessas e sem fragmentação, sugerindo maior resistência ao tecido em neofomação, todavia, sem diferenças na análise quantitativa desta proteína. Houve diferença nos parâmetros dos padrões clínicos, histológicos e histomorfométricos entre os grupos experimentais da presente investigação. A TFBML mostrou-se superior nas análises realizadas.

5 DISCUSSÃO GERAL

Apesar da ampla investigação na literatura acerca do uso de plantas medicinais e os seus benefícios nos diversos tipos de problemas de saúde, nem todos os constituintes bioativos, mecanismos de ação ou grau de tolerância tecidual são completamente conhecidos. No primeiro estudo, a ausência de diferenças nos parâmetros morfológicos e morfométricos avaliados entre os grupos experimentais, mostrou que o uso tópico da camomila é bem tolerado pelos tecidos, uma vez que não provocou alterações no padrão histológico da mucosa oral normal de ratos.

Dessa forma, o primeiro artigo contribui com a literatura acerca de conhecimentos fundamentais relacionados à segurança de uso da *M. recutita*, planta medicinal que possui benefício comprovado no controle dos microrganismos presentes no biofilme dental¹⁰, na gengivite¹¹, infecções orais¹² no manejo da MO¹⁴ e ulceração aftosa recorrente⁸.

Como descrito por Goes et al.¹³, em um estudo piloto com 30 pacientes se propuseram a avaliar os efeitos de um enxaguatório bucal contendo extrato de *M. recutita* para pacientes com gengivite associada a aparelhos ortodônticos fixos. Os pacientes receberam um kit de higiene oral contendo escova, fio dental e dentifrício fluoretado junto a um frasco de enxaguatório que poderia conter solução de clorexidina a 0,12%, extrato de *M. recutita* a 1%, ou uma solução placebo. Os autores observaram que pacientes que receberam enxaguatório bucal com CHX ou *M. recutita* exibiram uma redução no biofilme dental ($p=0,0001$) e do sangramento gengival ($p=0,003$), em comparação com o grupo placebo. Além desses achados clínicos, cinco pacientes do grupo CHX relataram queimação ou alteração do paladar após 14 dias de uso do colutório, enquanto a *M. recutita* foi bem tolerada e não foi associada a efeitos adversos.

Seyyedi et al.¹⁰ realizaram um ECR para investigar os efeitos terapêuticos do enxaguatório bucal com tintura de camomila na ulceração aftosa recorrente. Dos 50 participantes da pesquisa, 25 foram alocados no grupo camomila e o restante no grupo placebo, sendo instruídos a aplicar 10 gotas na cavidade oral, da solução do grupo ao qual estavam designados, três vezes ao dia. Os pacientes foram examinados clinicamente após 2, 4 e 6 dias e, em casos de persistência das lesões, permaneceram sendo examinados semanalmente. A duração da cicatrização, o número de lesões observadas em cada visita, o tamanho das lesões, possíveis efeitos colaterais da medicação, dor e queimação foram registrados usando uma escala visual analógica (EVA). O número médio de lesões no início do estudo foi de 2,95 no grupo camomila e de 2,67 no grupo controle, sendo que após 6 dias,

durante a quarta visita, registrou-se 1,3 no grupo controle e nenhuma lesão foi observada no grupo camomila. Em relação à dor e sensação de queimação na quarta visita, usando a EVA, foi zero (sem dor) no grupo camomila e 3,4 no grupo controle, sendo tal diferença estatisticamente significativa ($p < 0.001$). Os autores concluíram que o grupo de pacientes que utilizou a camomila teve o processo de cicatrização acelerado, visto que na segunda visita observou-se a remissão dos sintomas. Assim, a camomila mostrou-se um agente efetivo na condição da estomatite aftosa recorrente e pode ser utilizada sempre que apropriado.

De semelhante modo, é consenso na literatura²⁰ que a TFBML é capaz de deprimir a fase exsudativa ao mesmo tempo que aumenta os processos proliferativos durante a inflamação aguda e crônica^{2,73}. De modo que há possibilidade da redução do edema, transição de característica do infiltrado inflamatório de células polimorfonucleares para monomorfonucleares e estímulo à biosíntese de colágeno^{20,37,73}.

Uma vez que tanto a TFBML quanto a *M. recutita* são moduladores do processo inflamatório, conseqüentemente, capazes de promover a aceleração do reparo tecidual^{20,35-37} quando utilizadas de maneira isolada, e não foram encontrados na literatura investigada, estudos comparando ou correlacionando esses dois agentes terapêuticos, o segundo trabalho aqui descrito, traz à tona, informações primárias acerca do reparo tecidual sob influência dessas duas modalidades terapêuticas tanto de maneira isolada, como conjunta.

Em sua recente revisão sistemática, Dantas et al.⁴³ avaliaram o efeito do uso tópico da camomila na MO com parâmetros clínicos e/ou histológicos em modelo animal. Seus critérios de inclusão envolveram estudos experimentais em animais, cuja abordagem terapêutica foi exclusivamente o uso de camomila tópica sob diferentes concentrações, sem associação com outros agentes. Um total de dois trabalhos foram incluídos na referida revisão, ambos do mesmo grupo de pesquisa, dessa forma, tratou-se de estudos que utilizaram metodologias semelhantes na indução da MO e ferida em mucosa jugal de hamsters. Foi preconizado início do uso da pomada com 100 mg de extrato fluido de camomila (AdMuc®) no 5º dia. Os resultados revelaram que a aplicação tópica de camomila foi eficaz no tratamento da MO induzida por quimioterápicos. Os autores concluem que a camomila apresentou resultados clínicos e histopatológicos positivos e a capacidade de reduzir os níveis de algumas citocinas pró-inflamatórias.

Também em uma revisão sistemática Suter, Sjölund, Bornstein⁷⁴, investigaram a ação do uso do laser sobre a cicatrização e dor de pacientes sob tratamento de estomatites aftosas. Foram incluídos 11 artigos no estudo, dentre os quais, 9 avaliam o reparo tecidual e dentre estes, 5 observaram redução do tempo de cicatrização após a irradiação tanto com laser de

CO₂, laser de Nd:YAG e laser de diodo. A TFBML mostrou ser uma opção viável para aliviar os sintomas e promover a cicatrização de feridas, com o benefício de apresentar baixo risco de efeitos colaterais.

Os resultados encontrados no presente trabalho, ressaltam que, efetivamente, estes agentes são capazes de modular as fases que envolvem o processo do reparo tecidual. Ao avaliar-se apenas clinicamente, as terapêuticas não se sobrepõem uma a outra de forma evidente, de modo que todas contribuem para a cicatrização tecidual. Contudo, a análise histológica demonstra superioridade do uso da *M. recutita*, sob formulação de extrato fluido, e da TFBML isoladas. Surpreendentemente, o uso associado de ambas as terapêuticas não pareceu contribuir para o processo do reparo tecidual em mucosa oral de ratos, sobre o modelo experimental estabelecido.

Uma vez que o número amostral mínimo foi utilizado em ambos os experimentos, perdas imprevistas que ocorreram, limitaram a análise morfológica a uma avaliação descritiva dos dados relacionados a tais parâmetros. Ainda, com intuito de reduzir o número de animais incluídos, optou-se por utilizar metodologia semelhante à de Pavesi et al.⁴¹ no Artigo 1, onde um quantitativo ainda menor de ratos foi utilizado no grupo *Controle/baseline*.

Outra limitação encontrada foi referente aos recursos disponíveis para uso nas análises, em especial durante o período vigente da pesquisa, que se estendeu ao longo da pandemia de COVID-19. Sabe-se que análises com biomarcadores específicos para citocinas e/ou fatores de crescimento, trariam dados relevantes, cujas análises ampliariam o conhecimento acerca dos fenômenos moleculares e das vias envolvidas nos experimentos, contudo, tais avaliações não foram possíveis de serem realizadas. De semelhante modo, também não foi possível realizar testes específicos para se conhecer a concentração exata da *M. recutita* e os constituintes bioativos presentes nas formulações utilizadas.

Fica evidente, nos resultados aqui apresentados e discutidos, que a *M. recutita* é uma planta medicinal com real ação de modulação positiva do reparo tecidual. Todavia, outros estudos que aprofundem as análises aqui propostas, bem como sugiram novas formas de uso desta substância, são necessários para reafirmar esta ação. A constante demanda pelo uso de fitoterápicos e a necessidade de maior conhecimento sobre seus mecanismos de ação parecem ser estímulos para futuras investigações.

6 CONCLUSÃO GERAL

- O uso tópico da *M. recutita*, independentemente da forma de apresentação investigada, não provocou alterações teciduais macroscópicas e microscópicas. Tal agente utilizado de maneira isolada ou associada à TFBML, modulou positivamente diferentes etapas do reparo tecidual. Entretanto, melhores resultados foram encontrados quando estes agentes terapêuticos foram utilizados isoladamente.

6.1 EXPERIMENTO EM MUCOSA ORAL NORMAL

- A aplicação tópica da *M. recutita* sob diferentes formulações, não provocou alterações clínicas ou no tecido de revestimento oral normal.
- A avaliação histomorfométrica dos parâmetros investigados no tecido oral normal não exibiu modificações sob ação da *M. recutita*.

6.2 EXPERIMENTO COM ÚLCERA EM DORSO LINGUAL

- A análise clínica revelou que todos os grupos apresentaram redução da ferida oral do 3º ao 7º dia, com superioridade nos animais submetidos à TFBML de forma isolada.
- Ao se avaliar os parâmetros histológicos do reparo tecidual, tanto o Extrato fluido da camomila, como a TFBML contribuíram de maneira mais efetiva para a resolução da fase exsudativa da inflamação e do estímulo da fase proliferativa. Contudo, o grupo da TFBML isoladamente foi ainda superior nos quesitos avaliados.
- A re-epitelização das feridas avaliadas pela histomorfometria, evidenciou diferenças ao longo do tempo para todos os grupos estudados, todavia, aos 14 dias, observou-se redução das camadas epiteliais nos grupos G2 e G5.
- Com relação à organização e ao quantitativo de deposição de colágeno tecidual, observou-se que aos 14 dias, todos os grupos apresentaram resultados semelhantes. Entretanto, na análise morfológica, notou-se que os grupos tratados com TFBML apresentaram fibras colagênica mais espessas e sem fragmentação, sugerindo maior resistência ao tecido em neofomação.

- Houve diferença nos parâmetros dos padrões clínicos, histológicos e histomorfométricos entre os grupos experimentais da presente investigação. A TFBML mostrou-se superior nas análises realizadas.

REFERÊNCIAS

1. Mendonça RJ, Coutinho-Netto J. Aspectos celulares de cicatrização. *An Bras Dermatol.* 2009;84(3):257-62.
2. Eming AS, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014 Dec3;6(265):265sr6. doi:10.1126/scitranslmed.3009337
3. Wagner VP, Meurer L, Martins MAT, Danilevicz CK, Magnusson AS, Marques MM, et al. Influence of different energy densities of laser phototherapy on oral wound healing. *J Biomed Opt.* 2013;18(12):128002. doi:10.1117/1.JBO.18.12.128002
4. Ministério da Saúde (R). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 267, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. *Diário Oficial da União*, 23 ago.2005.
5. Singh O, Khanam Z, Misra N, Srivastava M.K. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy* 2011;5(9):82-95. doi:10.4103/0973-7847.79103
6. McKay DL, Blumberg JB. A Review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.) *Phytother Res.* 2006;20:519-30. doi: 10.1002/ptr.1900
7. Salehi B, Lopez-Jornet P, Pons-Fuster López E, Calina D, Sharifi-Rad M, Ramírez-Alarcón K, Sharifi-Rad J. Plant-derived bioactives in oral mucosal lesions: a key emphasis to curcumin, lycopene, chamomile, aloe vera, green tea and coffee properties. *Biomolecules.* 2019;9(3):106.
8. Pazyar N, Yaghoobi R, Rafiee E, Mehrabian A, Feily A. Skin Wound Healing and Phytomedicine: a review. *Skin Pharmacol Physiol.* 2014;27:303-10.
9. Oliveira BV, Silva PGB, Nojosa JS, Brizeno LAC, Ferreira JM, SOUSA FB et al. TNF-alpha expression, evaluation of collagen, and TUNEL of *Matricaria recutita* L. extract and triamcinolone on oral ulcer in diabetic rats. *J Appl Oral Sci.* 2016;24(3):278-90.
10. Seyyedi SA, Sanatkhan M, Pakfetrat A, Olyae P. The therapeutic effects of chamomilla tincture mouthwash on oral aphthae: A Randomized Clinical Trial. *J Clin Exp Dent.* 2014;6(5):e535-8. doi:10.4317/jced.51472
11. Martins MD, Marques MM, Bussadori SK, Martins MAT, Pavesi VCS, Mesquita-Ferrari RA, et al. Comparative Analysis between *chamomilla recutita* and corticosteroids on wound healing. An *in vitro* and *in vivo* study. *Phytother Res.* 2009;23(2):274-8. doi: 10.1002/ptr.2612
12. Pequeno MA, Silvestre MR, Amêndola I, Silva CRG, Leão MVP, Santos SSF. *Matricaria Recutita* Extract (Chamomile) to Reduce *Candida Albicans* and *Enterobacter Cloacae* Biofilms: *in vitro* study. *Rev Gaúch Odontol.* 2018;66(2):00-00. doi:10.1590/1981-863720180002000033328

13. Goes P, Dutra CS, Lisboa MRP, Gondim DV, Leitão R, Brito GAC, et al. Clinical efficacy of a 1% *Matricaria chamomile* L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. *J Oral Sci.* 2016;58(4):569-74.
14. Rahman H, Chandra A. Microbiologic evaluation of *matricaria* and chlorhexidine against *E. faecalis* and *C. albicans*. *Indian J Dent.* 2015;6(2):60-4. doi: 10.4103/0975-962X.155876
15. Morales-Bozo I, Ortega-Pinto A, Rojas Alcayaga G, Aitken Saavedra JP, Salinas Flores O, Lefimil Puente C, et al. Evaluation of the effectiveness of a chamomile (*Matricaria chamomilla*) and linseed (*Linum usitatissimum*) saliva substitute in the relief of xerostomia in elders. *Gerodontology.* 2016; 34:42-8. doi: 10.1111/ger.12220
16. Gomes VTS, Gomes RNS, Gomes MS, Joaquim WM, Lago EC, Nicolau RA. Effects of *Matricaria Recutita* (L.) in the treatment of oral mucositis. *Sci World J.* 2018;1-8. doi:10.1155/2018/4392184
17. Ad-Muc [Internet]. São Paulo: Biolab Farmacêutica Ltda [citado 2022 mar 01]. Disponível em: <https://consultaremedios.com.br/ad-muc/bula>.
18. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med.* 2012;237:1241-8.
19. Ribeiro MAG, Albuquerque RLC, Ramalho LMP, Pinheiro ALB, Bonjardim LR, Da Cunha SS. Immunohistochemical assessment of myofibroblasts and lymphoid cells during wound healing in rats subjected to laser photobiomodulation at 660 nm. *Photomed Laser Surg* 2009;27(1):49-55. doi:10.1089/pho.2007.2215
20. Bourguignon-Filho AM, Feitosa ACR, Beltrao GC. Use of low level laser therapy on wound healing. Literature review. *Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac.* 2005;46(1):37-43.
21. Sardari F, Ahrari F. The effect of low-level helium-neon laser on oral wound healing. *Dent Res J.* 2016;13:24-9.
22. Medrado AP, Costa T, Prado T, Reis SRA, Andrade ZA. Phenotype characterization of pericytes during tissue repair following low-level laser therapy. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2010;26(4):192-7. doi:10.1111/j.1600-0781.2010.00521.x
23. Medrado AP, Soares AP, Santos ET, Reis SRA, Andrade ZA. Influence of laser photobiomodulation upon connective tissue remodeling during wound healing. *J Photochem Photobiol B.* 2008;92(3):144-52. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.0
24. Cunha JLS, Carvalho FMA, de Pereira Filho RN, Ribeiro MAG, de Albuquerque-Júnior RLC. Effects of different protocols of low-level laser therapy on collagen deposition in wound healing. *Braz Dent J.* 2019;30(4):317-24. doi:10.1590/0103-6440201902400

25. Rambo CSM, Silva Jr JA, Serra AJ, Ligeiro AP, Vieira RP, Albertini R, et al. Comparative analysis of low-level laser therapy (660 nm) on inflammatory biomarker expression during the skin wound-repair process in young and aged rats. *Lasers Med Sci* 2014;29:1723-33. doi: 10.1007/s10103-014-1582-8
26. Stoopler ET, Sollecito TP. Oral mucosal diseases: evaluation and management. *Med Clin* 2014;98(6):1323-52.
27. Fitzpatrick SG, Cohen DM, Clark AN. Ulcerated lesions of the oral mucosa: clinical and histologic review. *Head Neck pathol.* 2019;13(1):91-102.
28. Reis PED, Ciol MA, De Melo NS, Figueiredo PT, Leite AF, Manzi N de. Chamomile infusion cryotherapy to prevent oral mucositis induced by chemotherapy: a pilot study. *Support Care Cancer.* 2016;24(10):4393-8. doi: 10.1007/s00520-016-3279-y
29. Tavakoli Ardakani M, Ghassemi S, Mehdizadeh M, Mojab F, Salamzadeh J, Ghassemi S, et al. Evaluating the effect of *Matricaria recutita* and *Mentha piperita* herbal mouthwash on management of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A randomized, double blind, placebo controlled clinical trial. *Complement Ther Med.* 2016;29:29-34. doi:10.1016/j.ctim.2016.08.001
30. Braga FTMM, Santos ACF, Bueno PCP, Silveira RCCP, Santos CB, Bastos JK, Carvalho EC. Use of *Chamomilla recutita* in the prevention and treatment of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Nurs.* 2015;38(4):322-9. doi:10.1097/ncc.000000000000019
31. Elad S, Cheng KKF, Lalla RV, Yarom N, Hong C, Logan RM, Zadik Y. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. *Cancer.* 2020 Oct 1;126(19):4423-31. doi: 10.1002/cncr.33100
32. Cronshaw M, Parker S, Anagnostaki E, Mylona V, Lynch E, Grootveld M. Photobiomodulation and oral mucositis: a systematic review. *Dent J.* 2020;8(3): 87. doi:10.3390/dj8030087
33. Gobbo M, Verzegnassi F, Ronfani L, Zanon D, Melchionda F, Bagattoni S, et al. Multicenter randomized double blind controlled trail to evaluate bthe efficacy of laser therapy for the treatment of severe oral mucositis induced by chemotherapy in children: IaMPO RCT. *Pediatr Blood Cancer.* 2018;65:e27098
34. Bispo MS, Nascimento DS, Dantas JBL, Lima HR, Medrado ARAP, Carrera M, et al. Frequência de comorbidades associadas ao tratamento radioterápico de cabeça e pescoço. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2018;17:185-9.
35. Cicchelli MQ, Guerreiro L, Costa AS, Marques RSO, Carrera M, Martins GB, et al. Mucosite Oral induzida por terapia oncológica - Uma revisão de literatura.. *Rev Ciênc Méd Biol.* 2017;16:85-8.

36. Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch A, Murphy BA, Kolnick L, et al. Oral complications of cancer and cancer therapy. *CA Cancer J Clin.* 2012;62:400-22.
37. Ariyawardana A, Cheng KKF, Kandwal A, Tilly V, Al-Azri AR, Galiti D, et al. Systematic review of anti-inflammatory agents for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2019;27(10):3985-95.
38. Sonis ST. Oral mucositis in cancer therapy. *J Support Oncol* 2004;2:3-8.
39. Barkokebas A, Silva IH, de Andrade SC, Carvalho AA, Gueiros LA, Paiva SM, et al. Impact of oral mucositis on oralhealth-related quality of life of patients diagnosed with cancer. *J Oral Pathol Med.* 2015;44:746-51.
40. Loreti EH, Pascoal VLW, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF. Use of laser therapy in the healing process: a literature review. *Photom Laser Surg.* 2015;33:104-16.
41. Pavesi VC, Lopez TC, Martins MA, Sant'Ana Filho M, Bussadori SK, Fernandes KP, et al. Healing action of topical chamomile on 5-fluoracil induced oral mucositis in hamster. *Support Care Cancer.* 2011;19(5):639-46. doi: 10.1007/s00520-010-0875-0
42. Reis SRA, Medrado AP, Marchionni AMT, Figueira C, Fracassi LD, Knop LAH. Effect of 670-nm laser therapy and dexamethasone on tissue repair: a histological and ultrastructural study. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(4):307-13. doi:10.1089/pho2007.2151
43. Dantas JBL, Martins GB, Lima HR, Carrera M, Reis SRA, Medrado ARAP. Evaluation of preventive laser photobiomodulation in patients with head and neck cancer undergoing radiochemotherapy: laser in patients with head and neck cancer. *Spec Care Dentist.* 2020;40(4):364-73. doi:10.1111/scd.12486
44. Duarte CM, Quirino MR, Patrocinio MC, Anbinder AL. Effects of *Chamomilla recutita* (L.) on oral wound healing in rats. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(6):716-21.
45. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado ARAP. Cicatrização cutânea - uma revisão da literatura. *An Bras Dermatol.* 2016 Sept-Oct;91(5):614-20. doi: 10.1590/abd1806-4841.20164741
46. Mason DE, Mitchell KE, Li Y, Finley MR, Freeman LC. Molecular basis of voltage-dependent potassium currents in porcine granulosa cells. *Mol Pharmacol.* 2002;61:201-13.
47. Kumar R, Katoc, SS, Sharma,S. Betaadrenoceptor agonist treatment reverses denervation atrophy with augmentation of collagen proliferation in denervated mice gastrocnemius muscle. *Indian J Exp Biol.* 2006; 44:5:371-6.

48. Nikoloudaki G, Creber K, Hamilton DW. Wound healing and fibrosis: a contrasting role for periostin in skin and the oral mucosa. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2020;318(6):C1065-77. doi:10.1152/ajpcell.00035.2020
49. Häkkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol*. 2000;24:127-52. doi:10.1034/j.1600-0757.2000.024001127.x
50. Mah W, Jiang G, Olver D, Cheung G, Kim B, Larjava H, Häkkinen L. Human gingival fibroblasts display a non-fibrotic phenotype distinct from skin fibroblasts in three-dimensional cultures. *PLoS ONE*. 2014;9:e90715.
51. Rodero MP, Khosrotehrani K. Skin wound healing modulation by macrophages. *Int J Clin Exp Pathol*. 2010;3(7):643.
52. Dorta EJ. Introdução. In: *Escala Rural: especial de plantas medicinais*. 1(4). São Paulo: Escala Ltda; 1998. p.1-62.
53. Eldin S, Dunford A. *Fitoterapia na atenção primária a saúde*. São Paulo: Manole; 2001.
54. Martins ER, Castro DM, Castellani DC, Dias JE. *Plantas medicinais*. Viçosa: Ed. UFV; 2000.
55. Organização Mundial de Saúde. *Traditional medicine: definitions*. 2008.
56. Alves DL, Silva CR. *Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal*. São Paulo: Atheneu; 2002.
57. Nicoletti MA, Oliveira-Júnior MA, Bertasso CC, Caporossi PY, Tavares APL. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. *Infarma*. 2007;19:32-50.
58. The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. *Guidelines on the conservation of medicinal plants*. Switzerland: IUNC; 1993.
59. Ferreira VF, Pinto AC. A Fitoterapia no mundo atual. *Quim. Nova*. 2010;33(9):1829.
60. Duraz AY, Khan SA: Knowledge, attitudes and awareness of community pharmacists towards the use of herbal medicines in Muscat region. *Oman Med J*. 2011;26:451-3.
61. Tomazzoni MI, Negrelle RRB, Centa ML. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. *Texto Contexto Enferm*. 2006;15(1):115-21.
62. Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Junior VF, Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*. 2002;25(3): 429-38.
63. O'Hara M, Kiefer D, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. *Arch Fam Med*. 1998;7:523-36.
64. Miraj S, Alesaeidi S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuita* chamomile (chamomile). *Electronic Physician*. 2016;8(9):3024-31. Doi: <http://dx.doi.org/10.19082/3024>

65. Vieira A, Guimarães MA, David GQ, Karsburg IV, Campos ANR. Efeito genotóxico da infusão de capítulos florais de camomila. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*. 2009;3(1)8-13.
66. Srivastava JK, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Mol Med Report*. 2010;3(6):895-901. doi:10.3892/mmr.2010.377
67. Hamon N. Herbal medicine. The Chamomiles. *Can Pharm J*. 1989;612.
68. Satyal P, Shrestha S, Setzer WN. Composition and Bioactivities of an (E)- β -Farnesene Chemotype of Chamomile (*Matricaria chamomilla*) Essential Oil from Nepal. *Natural Product Communications* 2015;10(8):1453-7.
69. Lucena RN, Lins RDAU, Ramos INC, Cavalcanti AL, Barbosa Gomes RCB, Maciel MAS. Comparative clinical evaluation of the antiinflammatory efficacy of *Matricaria recutita* and chlorhexidine in patients with chronic gingivitis. *Rev Bras Pesq Saúde*. 2009;11(3):31-6.
70. Curra M, Martins MAT, Lauxen IS, Peliccolli ACA, Santan'a Filho M, Pavesi VCS, et al. Effect of topical chamomile on immunohistochemical levels of IL-1b and TNF-a in 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71:293-99.
71. Czelusniak KE, Brocco A, Pereira DF, Freitas GBL. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Rev Bras Plantas Med*. 2012;14(2):400-9.
72. Nayak BS, Raju SS, Rao AV. Wound healing activity of *Matricaria recutita* L. extract. *J Wound Care*. 2007;16:298-302.
73. Hsiao G, Shen MY, Fang CL, Chou DS, Lin CH, Chen TF, et al. Morphinepotentiated platelet aggregation in in vitro and platelet plug formation in in vivo experiments. *J Biomed Sci*. 2003;10(3):292-301.
74. Jarrahi M, Vafaei AA, Taherian AA, Miladi H, Rashidi Pour A. Evaluation of topical *Matricaria chamomilla* extract activity on linear incisional wound healing in albino rats. *Nat Prod Res*. 2010;24(8):697-702. doi:10.1080/14786410701654875
75. Dantas JBL, Freire TFC, Sanches ACB, Araujo RPC, Martins GB. Action Of *Matricaria Recutita* In The Management Of Oral Mucositis In Animal Model: systematic literature review. *Int J Adv Eng Res Sci*. 2021;8:133-42.
76. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. 1999. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis* 1999;20(10):1945-52.

77. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, et al. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol.* 1995;147(2):278-92.
78. Safayhi H, Sabieraj J, Sailer ER, Ammon HP. 1994. Chamazulene: an antioxidant-type inhibitor of leukotriene B4 formation. *Planta Med.* 1994;60:410-3.
79. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder R A, Carey F, Hoult JRS. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol.* 1988;40(11):787-92.
80. Heiskanen V, Hamblin MR. Photobiomodulation: lasers vs light emitting diodes? *Photochem Photobiol Sci.* 2018 Aug 08;17(8):1003-17. doi:10.1039/c8pp00176f
81. Huang YY, Chen AC, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response.* 2009;7(4):358-83. doi:10.2203/dose-response.09-027. Hamblin
82. Chung H, Dai T, Sharma S, Huang YY, Carroll J, Hamblin M. The nuts and bolts of low level laser therapy. *Ann Biomed Eng.* 2012;40:516-33.
83. Musstaf RA, Jenkins DFL, Jha AN. Assessing the impact of low level laser therapy (LLLT) on biological systems: a review. *Int J Radiat Biol.* 2019;95(2):120-43. doi: 10.1080/09553002.2019.1524944
84. Avci P, Nyame TT, Gupta GK, Sadasivam M, Hamblin MR. Low-level laser therapy for fat layer reduction: a comprehensive review. *Lasers Surg Med.* 2013;45(6):349-57.
85. Kuffler DP. Photobiomodulation in promoting wound healing: a review. *Regenerative Medicine.* 2016;11:107-22. doi:10.2217/rme.15.82
86. Hamblin MR, Demidova TN. Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE.* 2006;6140:1-12. doi: <https://doi.org/10.1117/12.646294>
87. Andrade FSS, Clark RMO, Ferreira ML. Efeitos da laserterapia de baixa potência na cicatrização de feridas cutâneas. *Rev Col. Bras. Cir.* 2014;41(2):129-33.
88. Viegas VN, Abreu MER, Viezzer C, Machado DC, Sant'anna Filho M, SilvaDN, et al. Effect Of low-level laser therapy on inflammatory reactions during wound healing: comparison with meloxicam. *Photomed Laser Surg.* 2007;25:467-73
89. Suter VGA, Sjölund S, Bornstein MM. Effect of laser on pain relief and wound healing of recurrent aphthous stomatitis: a systematic review. *Lasers Med Sci.* 2017;32(4):953-63. doi:10.1007/s10103-017-2184-z
90. He WL, Yu FY, Li CJ, Pan J, Zhuang R, Duan PJ. A systematic review and metaanalysis on the efficacy of low-level laser therapy in the management of complication after mandibular third molar surgery. *Lasers Med Sci.* 2015;30(6):1779-88.

91. Oliveira FLM, Silva DN, Rosetti EP, Barbosa JSA, Venancio MAAS, Bertollo RM. Efeito do laser de baixa potência de asgaal no pós-operatório de cirurgias de terceiros molares inferiores. *Braz J Dev.* 2021;7:97416-26.
92. Zadik Y, Arany PR, Fregnani ER, Bossi P, Antunes HS, Elad S. Systematic review of photobiomodulation for the management of oral mucositis in cancer patients and clinical practice guidelines. *Support Care Cancer.* 2019 doi:10.1007/s00520-019-04890-2
93. Ministério da Saúde (BR). Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet]. Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998 [acesso em 2022 jan 26]. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/svs/1/1998/prt0519_26_06_199.
94. Martins GB. Efeito do laser não-ablativo no reparo de úlceras produzidas em língua de ratos submetidos à radioterapia na região de cabeça [tese]. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; 2004.
95. Pelisser A, Vier-Pelisser FV, Fontanella VRC, Figueiredo MAZ. Análise microscópica do efeito da radioterapia fracionada por cobalto-60 em mandíbula de rato. *Radiol Bras.* 2007;40(2):113-8.
96. Santos UV, Santos BS, Silva GF, Constant PBL, Santos JAB. Avaliação de potencial de ervas medicinais: capim-limão (*cymbopogon citratus d.c.*), chá verde (*camellia sinensis l.*) e hibisco (*Hibiscus sabdariffa L.*) para obtenção de chás solúveis. *GEINTEC.* 2014;4(4):1399-408. doi: 10.7198/S2237-0722201400040013
97. Organização Mundial da Saúde. Estratégia da OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Genebra: OMS; 2002. 74p.
98. Silva CA, Cocco DDA, Borges LDF, Rodrigues TS, Vieira CU, Bonetti AM, et al. Avaliação do efeito do extrato de camomila sobre a redução da crise epiléptica em *drosophila melanogaster*. *Getec.* 2017;6(13):56-68.
99. Sebai H, Jabri MA, Souli A, Hosni K, Rtibi K, Tebourbi O, et al. Chemical composition, antioxidant properties and hepatoprotective effects of chamomile (*Matricaria recutita L.*) decoction extract against alcohol-induced oxidative stress in rat. *Gen Physiol Biophys.* 2015;34(3):263-75. doi:10.4149/gpb_2014039
100. Arruda JT, Approbato FC, Maia MCS, Silva TM, Approbato MS. Efeito do extrato aquoso de camomila (*Chamomilla recutita L.*) na prenhez de ratas e no desenvolvimento dos filhotes. *Rev Bras Plantas Med.* 2013;15(1):66-71.
101. Falkowski GJS, Jacomassi E, Takemura OS. Qualidade e autenticidade de amostras de chá de camomila (*Matricaria recutita L.* - Asteraceae). *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2009;68:64-72.
102. Brasil. Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. *Diário Oficial da União.* 9 out 2008.

103. Zeni ALB, Parisotto AV, Mattos G, Santa Helena ET. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. *Ciênc Saúde Colet.* 2017;22(8):2703-12. doi: 10.1590/1413-81232017228.18892015
104. Pereira LLS, Souza SP, Silva MC, Carvalho GA, Santos CD, Corrêa AD, et al. Atividade das glicosidases na presença de chá verde e de chá preto. *Rev Bras Plantas Med.* 2010;12(4):516-8.
105. Salum FG, Cherubini K, Amenábar JM. Modelos animais empregados em pesquisas que testam o efeito da aplicação de agentes químicos na mucosa bucal. *RFO UPF.* 2004;9(2):7-12.
106. Barbosa FS. Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea [dissertação]. Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica; 2011. p. 89-99.
107. Myose Y, Hikiji H, Tsujisawa T, Sonoki K, Yada N, Inoue H. Macrophage-mediated repair of intraepithelial damage in rat oral mucosa. *Arch Oral Biol.* 2019;97:185-90.
108. Ribeiro BF, Albuquerque ACL, Barroso KMA, Carvalho SHG, Soares MSM. Marcadores biológicos e etiopatogenia do líquen plano bucal. *Odontol Clín Cien.* 2010;9(1):19-23.
109. Carvalho WA, Lemônica L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Rev Bras Anestesiol.* 1998;48(2):137-58.
110. Montanari T. *Histologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas [recurso eletrônico]*. 3. ed. Porto Alegre: Edição do Autor; 2016.
111. Salum FG, Cherubini K, de Figueiredo MAZ, Amado MO, Rodrigues ET, Yurgel LS. Histologic evaluation of effect of thiocyanate topical application on hamster cheek pouch. *Clin Oral Invest.* 2006;10(3):211-5. doi: 10.1007/s00784-006-0054-3.
112. Pinto JLPS. Estudo descritivo da angioarquitetura da bolsa jugal de Hamster Sírio Dourado (*Mesocricetus auratus*) - Monografia- Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2015. 46f.
113. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. *ABCD arq bras cir dig.* 2007;20:51-8. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-67202007000100010>
114. Abu-Al-Basal MA. Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/c mice. *J Ethnopharmacol.* 2010;131(2):443-50.
115. Medeiros AC, Dantas Filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *J Surg Cl Res.* 2016;7(2):87-102.
116. Cavalcanti JM, Leal-Cardoso JH, Diniz LRL, Portella VG, Costa CO, Linard CFBM, et al. The essential oil of *Croton zehntneri* and trans-anethole improves cutaneous wound healing. *J Ethnopharmacol.* 2012;144(2):240-7.

117. Fortuna T, Gonzalez AC, Sá MF, Andrade ZA, Reis SRA, Medrado ARAP. Effect of 670 nm laser photobiomodulation on vascular density and fibroplasia in late stages of tissue repair. *Int Wound J.* 2018; 15:274-82. doi: 10.1111/iwj.12861
118. Ma Q, Fan Y, Luo Z, Cui Y, Kang H. Quantitative analysis of collagen and capillaries of 3.8- μ m laser-induced cutaneous thermal injury and wound healing. *Las Med Sci.* 2021;36(7):1469-77.
119. Czczot H, Kuzstelak J. A study of the genotoxic potential of flavonoids using short-term bacterial assays. *Acta Biochim Pol.* 1993;40(4):549-54.
120. Ubessi C, Tedesco SB, Silva CB, Baldoni M, Krysczun DK, Heinzmann BM, et al. Antiproliferative potential and phenolic compounds of infusions and essential oil of chamomile cultivated with homeopathy. *J Ethnopharmacol.* 2019;239:111907. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111907>.
121. Romero-Jiménez M, Campos-Sánchez J, Analla M, Munõz-Serrano A, Alonso-Moraga A. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research.* 2005;585:147-55. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.05.004
122. Hernández-Ceruelos A, Madrigal-Santillán E, Morales-González JÁ, Chamorro-Cevallos G, Cassani-Galindo M, Madrigal-Bujaidar E. *Int J Mol Sci.* 2010;11:3793-802. doi:10.3390/ijms11103793
123. Guo S, Dipietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29. doi: 10.1177/0022034509359125
124. Fleiss JL, Levin B, Paik MC. *Statistical methods for rates and proportions.* John Wiley & sons, 2013. 800p.
125. de Farias Gabriel A, Wagner VP, Correa C, Webber LP, Pilar EFS, Curra M, et al. Photobiomodulation therapy modulates epigenetic events and NF- κ B expression in oral epithelial wound healing. *Las Med Sci.* 2019;34(7):1465-72.
126. Machado RS, Viana S, Sbruzzi G. Low-level laser therapy in the treatment of pressure ulcers: systematic review. *Las Med Sci.* 2017;32(4):937-44.
127. Chaushu L, Rahmanov Gavriellov M, Chaushu G, Zar K, Vered M. Orabase Promotes Oral Epithelization in a Wound Healing Rat Model: An Immunohistochemical Study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2021;29(5):e39-45.
128. Pérez-Recalde M, Arias IER, Hermida ÉB. Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review. *Phytomedicine.* 2018;38:57-65.
129. Wyganowska-Swiatkowska M, Urbaniak P, Szkaradkiewicz A, Jankun J, Kotwicka M. Effects of chlorhexidine, essential oils and herbal medicines (Salvia, Chamomile, Calendula) on human fibroblast in vitro. *Cent Eur J immunol.* 2016;41(2):125.

130. Lim H, Kim HP. Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids. *Planta Med.* 2007;73:1267-74.
131. Calin MA, Coman T, Calin MR. The effect of low level laser therapy on surgical wound healing. *Rom Rep in Phys.* 2010;62:617-27.
132. Choi H, Lim W, Kim I, Kim J, Ko Y, Kwon H, et al. Inflammatory cytokines are suppressed by light-emitting diode irradiation of p. gingivalis lps-treated human gingival fibroblasts: inflammatory cytokine changes by LED irradiation. *Lasers Med. Sci.* 2012;27:459-67
133. Martignago CC, Oliveira RF, Pires Oliveira DA, Oliveira PD, Pacheco SC, Monzani PS, et al. Effect of low-level laser therapy 55 on the gene expression of collagen and vascular endothelial growth factor in a culture of fibroblast cells in mice. *Las Med Sci.* 2015;30:203-8.
134. Paiva PRVde, Tomazoni SS, Johnson DS, Vanin AA, Albuquerque-Pontes GM, Machado CDSM, et al. Photobiomodulation therapy (PBMT) and/or cryotherapy in skeletal muscle restitution, what is better? A randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *Las Med Sci.* 2016;31(9):925-1933.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Revisão narrativa da literatura

The role of *Matricaria recutita* in health and dental practice: a narrative Literature Review.

Tila Fortuna¹, Juliana Borges de Lima Dantas², Roberto Paulo Correia de Araújo³, Elisângela de Jesus Campos⁴, Gabriela Botelho Martins⁵

¹ PhD student at the Postgraduate Program in Interactive Processes of Bodies and Systems. Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (ICS, UFBA).

Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). ZIP code: 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. | Tel.: (+55) (71) 3283-8891 | E-mail: tilafortuna@gmail.com

² PhD student at the Postgraduate Program in Interactive Processes of Bodies and Systems. Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (ICS, UFBA).

Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). ZIP code: 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. | Tel.: (+55) (71) 3283-8891 | E-mail: judyborges@gmail.com

³ Professor of the Institute of Health Sciences, Federal University of Bahia (ICS, UFBA).

Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). ZIP code: 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. | Tel.: (+55) (71) 3283-8891 | E-mail: rpcaraujo@hotmail.com

⁴ PhD in Medicine and Health from UFBA. Adjunct Professor at the Institute of Health Sciences at the Federal University of Bahia (ICS, UFBA).

Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). ZIP code: 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. | Tel.: (+55) (71) 3283-8891 | E-mail: elis.campos@terra.com.br

⁵ PhD in Clinical Stomatology from PUCRS. Associate Professor at the Institute of Health Sciences at the Federal University of Bahia (ICS, UFBA)

Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). ZIP code: 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil. | Tel.: (+55) (71) 3283-8891 | E-mail: gbmartinsba@gmail.com

Corresponding author: Tila Fortuna Costa Freire

Address: Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon s/n, Vale do Canela, 4º andar (sala 413). ZIP code: 40.110-100. Salvador, Bahia, Brasil.

Tel.: (+55) (71) 3283-8891

Email: tilafortuna@gmail.com

1. INTRODUCTION

The diversity of medicinal herbs and their functions in the prevention and treatment of different types of diseases, together with their natural characteristics associated with the absence or low rate of adverse effects, stimulates the worldwide consumption of plants for therapeutic purposes. Consequently, it increases the interest of health professionals in focusing on studying these agents and exploring their pharmacological properties [1].

Popularly known as chamomile, *Matricaria recutita* (*M. recutita*) belongs to a large group of medicinal plants that has been used since ancient times by Egyptians and Greeks, being native to Europe and distributed worldwide [2,3].

Its popularity is due to its composition, which consists of several bioactive phytochemicals. Chamomile is known to help improve cardiovascular conditions and stimulate the immune system [1]. Several authors also describe its antiseptic [1,4-6], diuretic [1,5], expectorant, sedative [5], and anti-inflammatory actions [1,4-6].

The active ingredient of chamomile can be applied in home medicine through the direct use of the plant in the form of preparations such as teas, tinctures, and powders, or in the form of isolated pure compounds. Medicinal herbs, when well-chosen and used correctly, have the same effectiveness as industrial medicine [7].

The benefits of chamomile in the different areas of dentistry have also been investigated and described. Chamomile has an action in the control of microorganisms present in dental biofilm [8] and in the management of conditions such as xerostomia⁹, mucositis [10-12], gingivitis [13-15], oral infections [16,17], recurrent aphthous ulceration [18], and even bone resorption [19].

Establishing when the therapeutic effects of this herbal agent will be beneficial or not for patients requires research and greater generation of scientific evidence. Thus, this work aims to describe the possible uses of *M. recutita* in the field of health, with emphasis on dental practice, emphasizing the benefits and possible means of formulation that have already been investigated and described in the literature.

2. LITERATURE REVIEW

The use of plants in human health has been documented for thousands of years. The enduring popularity of herbal medicines can be explained by the tendency of herbs to work slowly, usually with minimal toxic side effects [20]. However, the misconception that plants, as they are natural, are therefore free from risks and adverse effects, must be reevaluated. Obeying the prescribed dosages and taking care to accurately identify the substance used can prevent a series of complications [7]. According to Martins *et al.* [21], among the recommendations for treatments with medicinal plants in

general, is the maximum period of use between 21 and 30 days, interspersed with a rest period between 4 and 7 days

One of the herbs most often used for medicinal purposes is chamomile, whose tea and herbal extract are prepared from dried flowers of the *Matricaria* species. Chamomile is one of the oldest medicinal plants, widely used and well documented in the world, due to its antioxidant [4,22] and anti-inflammatory [4,5,23] properties, exhibiting many beneficial health effects, also due to its anti-allergenic, neuro-protective, antimicrobial, antimutagenic and hypocholesterolemic [4,23] action.

2.1 The *Matricaria recutita*

M. recutita is a plant species belonging to the list of Traditional Phytotherapeutic Products with Simplified Registration, published by Normative Instruction 02/2014 [24]. It is one of the most important medicinal herbs native to southern and eastern Europe. It is also grown in Germany, Hungary, France, Russia, Yugoslavia and Brazil. This plant can also be found in North Africa, Asia, North and South America, Australia and New Zealand [3,5].

Popularly known by several names, such as common chamomile, fragrant chamomile, German chamomile, Hungarian chamomile, Roman chamomile, English chamomile, fake sweet chamomile, pinhead and maíoca [5], there are a number of inaccuracies in relation to its name. The synonymous use of the names *Anthemis*, *Chamomilla* and *Matricaria* leads to uncertainty regarding the botanical identification of this plant. According to the literature, the best botanical name for real chamomile is *M. recutita*, whose synonym is *M. chamomilla*, *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, belonging to the genus *Chamomilla* and the family *Asteraceae* [5,25]. The nomenclature was proposed by Linneaus in the edition of his '*Espécie Plantarum*' [25], which justifies the abbreviation of 'L.' used by some authors.

True chamomile is an annual herbaceous plant with thin, spindle-shaped roots that only penetrate the soil. The cylindrical stem is erect, strongly branched and grows at a height ranging from 10 to 90 cm. The 11 to 27 small flowers with hollow yellow tapered centers, surrounded by white petals, are between 6 and 11 mm long, about 3.5 mm wide and are arranged concentrically [3,5,26].

2.2 Biochemical characteristics of Chamomile

More than 120 constituents have been identified in chamomile flowers. Its phytochemical analysis revealed that this plant is rich in cytoprotective active molecules, such as phenolic compounds, which are considered natural antioxidant agents [4,22].

Of the different bioactive constituents present in chamomile, the presence of sesquiterpenes, flavonoids, coumarins and polyacetylenes has already been identified [1,3,27]. The main components extracted from chamomile flowers that are described in the consulted literature are listed in Table 1.

Table 1 - Main bioactive constituents of chamomile.

| Components: | Action: | Derivatives: |
|---|---|---|
| Sesquiterpenes (Terpenoids) [3,6,27,28] | Antimicrobial [29], antioxidant, insecticide or repellent [30] | Farnesol [3] α -bisabolol [3,6,27] α -bisabolol A oxides [3,27] α -bisabolol B oxides [3,27] |
| Flavonoids [3,27,28] | Antiviral, antitumor, anti-inflammatory, antioxidant, hormonal regulation [31] and chemopreventive [32] | Apigenin [3,27] Apigenin-7-O-glycoside [3,27] Luteolin [3,27] Luteolin-7-O-glycoside [3,27] Quercetin [3,27] Routine [3] Naringenin [3,27] Patuletin [4] |
| Coumarins [3,27,28] | Anti-inflammatory, expectorant, cytotoxic, antifungal, insecticide and coronary vasodilator [33] | Herniarin [3] Umbelliferone [3] |
| Phenylpropanoids [3,27] | Antioxidant, insecticide or repellent [30] | Chlorogenic acid [3] Caffeic acid [3] |
| Matricin [3] | Antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant [26,27] | Chamazulene [3,6] |

Essential oils of *M. recutita* are mainly formulated with terpenes or their derivatives. These substances constitute an extensive group of organic molecules produced as secondary metabolites to prevent injuries caused by external agents [34], with recognized antimicrobial activity [29].

Bisabolol has been shown to promote the formation of granulation tissue in wound healing [35]. It has been found to reduce the amount of the proteolytic enzyme pepsin secreted by the stomach, without any changes in the amount of acid in the stomach, due to which it was recommended for the treatment of gastric and upper intestine diseases. It has also been reported to promote epithelialization and granulation, and to have a pronounced and antiphlogistic effect on edema [36].

The properties of chamomile are partly also due to its phenolic compounds [3]. Phenolic compounds are bioactive substances found in large quantities in food plants that are regularly consumed by humans. They are compounds that have a benzene ring, which may contain one or more hydroxyl groups (OH⁻), including their functional derivatives (esters, methyl ethers, glycosides) [37]. According to Gupta [38], eleven bioactive phenolic compounds were found in chamomile extract: herniarin and umbelliferone (coumarins), chlorogenic acid and caffeic acid (phenylpropanoids),

apigenin, apigenin-7-O-glucoside, luteolin and luteolin-7-O-glucoside (flavones), quercetin and rutin (flavonols), and naringenin (flavanone).

Chamomile's anti-inflammatory capacity is mainly attributed to apigenin and its acetylated derivatives. In addition to their anti-inflammatory action, flavonoids are also known to play an important role in chemopreventive activity against ultraviolet, anti-tumor and sedative radiation [31,32]. It is also known that flavonoids act by inhibiting the release of histamine [35].

Chamazulene (7-ethyl-1,4-dimethylazulene) is an artefactual component formed under high temperatures and/or acidic matrix conditions (procamazulene), which is present in the head of fresh flowers [4]. This compound characterizes the dark-blue color of chamomile oil and is related to its bactericidal, fungicidal, anti-inflammatory and antioxidant properties [26,27].

Herniarin and umbelliferone, derived from coumarins, represent approximately 0.1% of the total biochemical constituents of this medicinal plant; however, the amounts obtained from frequent consumption of teas are not insignificant [4]. Umbelliferone has a fungistatic action [36].

2.3 Formulations for use

The use of medicinal plants has evolved from the simplest forms of local treatment, to the technologically sophisticated forms of industrial manufacturing. Chamomile is widely marketed as herbal tea, as well as in ointments, soaps, tinctures, and inhalations [26].

There are several ways of preparing chamomile. The dry powder of the chamomile flower is recommended and used for several types of health problems, ranging from infections and injuries to the lining tissues, to gastrointestinal disorders, to sleep problems. Medicinal ingredients are traditionally extracted from dried flowers, using water, ethanol or methanol as solvents, and the corresponding extracts are known respectively as aqueous or alcoholic extracts, such as ethanolic and/or methanolic [6].

Aqueous extracts, as in the form of teas obtained through infusions, contain very low concentrations of free apigenin, but include high levels of apigenin-7-O-glycoside [39]. Teas made from chamomile contain between 10-15% of the essential oil available in flowers [4]. Chamomile infusion (tea) is the most common therapeutic presentation and is used as an agent for washing or gargling in order to treat inflammation of the mucous membranes of the mouth and throat [39,40]. Chamomile tea sachets, containing pure chamomile flower powder or mixed with other popular medicinal herbs, are easily found and commercialized [6].

The mixture of a part of chamomile flower in four parts of water with 12% of grain alcohol is used for the preparation of chamomile tincture [6], since the use of the whole plant serves to formulate beers and medicinal herbal lotion for topical application [41].

Chamomile oil is a popular ingredient in aromatherapy and hair care. The essential oil extracted from the flower varies in concentration between 0.42 to 2% and consists of compounds such as bisabolol, camazulene, cyclic sesquiterpenes, bisabolol oxides, and other azulenes and terpenes [26].

2.4 General therapeutic uses

M. recutita is a plant that has been used as a medicinal herb for centuries due to its relaxing, sedative, antispasmodic, antioxidant, anti-inflammatory, curative and digestive properties, among other properties already described [5,6].

In a systematic review of the literature, Miraj & Alesaeidi [1] describe the traditional therapeutic uses of *M. recutita*, which include its antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory, antidepressant, anticarcinogenic and angiogenic activity. In addition, the authors cite its hepatoprotective, antimicrobial, antidiabetic and antidiarrheal effects, and the applicability of this herbal medicine in premenstrual syndrome, gastrointestinal disorders and knee osteoarthritis.

The literature shows it has been prescribed for dyspepsia, stomach disorders in general [1,6,42], diarrhea[1,6,42], nausea, inflammation of the respiratory and urinary tracts, hemorrhoids [6,42], menstrual disorders [1,6,42], anxiety, neuralgia, sleep disorders, toothache, rheumatic pain, burns, thrush [6], difficult to heal wounds [42], skin and mucosal conditions in general, including herpes zoster and boils, inflammation of the mouth, throat, eyes and ears [6,42], and even as an acaricidal and anti-tick agent [43].

2.5 Applications in Dentistry

In Dentistry, studies describe the use of *M. recutita* for infection control, mainly due to its antimicrobial action, and as a therapeutic agent for several types of oral disorders, as described below.

2.5.1 Antimicrobial action

Albuquerque *et al.* [16], in an *in vitro* experimental study, evaluated the antimicrobial activity of *M. recutita* extract on the microorganisms present in dental biofilm. The authors compared the averages of the inhibitory halos formed in the cultivation of strains of *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, and *Lactobacillus casei* after

the action of 0.12% hydroalcoholic extract and chlorhexidine. According to the authors, although *M. recutita* at a concentration of 0.84 g/mL has antimicrobial activity, it was lower than that of 0.12% chlorhexidine, which was more effective in the antibacterial control of the strains investigated.

In 2011, Cárcamo *et al.* [44] investigated the antibacterial action of *M. recutita* mouthwash on the formation of dental biofilm in 32 female patients at the Dentistry college of the Universidad del Desarrollo, in Chile. The authors compared the action of chamomile and chlorhexidine mouthwashes at 0.12% concentration on oral prophylaxis after different periods of time, using a bacteriological sample collected from the mucosa and the dental surface. In their findings, they noted the superior effectiveness of chlorhexidine over chamomile in controlling colony-forming units (CFU). The mouthwash with chamomile reached as maximum control the formation of 1976 CFU two hours after rinsing the mouthwash. The mouthwash with chlorhexidine reached a control of up to 296 CFU eight hours after rinsing the mouthwash. According to the authors, the best time interval between mouthwashes with *M. recutita* is 4 to 6 hours, a period in which there is greater control of bacterial growth.

An *in vitro* study conducted by Rahman & Chandra [17] evaluated the antimicrobial activity of different concentrations of chamomile in aqueous base, between 15 and 25%, and 2% chlorhexidine gel on strains of *C. albicans* and *E. faecalis*. The authors used fluconazole for positive control of *C. albicans*, and vancomycin for *E. faecalis*. According to the authors, 2% chlorhexidine had a greater inhibitory effect for *C. albicans* (33.20 mm) and *E. faecalis* (24.54 mm), while 25% chamomile showed inhibition halos of 24.16 mm, and 20% of 62 mm for *C. albicans* and *E. faecalis*, respectively. Chamomile at 15% did not show antimicrobial activity. The authors conclude that 25% chamomile proved to be an antimicrobial agent for the strains investigated, despite being less effective than 2% chlorhexidine.

Another *in vitro* study published in 2018 [8] evaluated the inhibitory activity of the hydroalcoholic extract of *M. recutita* at 100, 200 and 300 mg/mL, on strains of *C. albicans* and *Enterobacter cloacae* compared to 0.12% chlorhexidine digluconate and distilled water. According to the authors, the extract of *M. recutita* at 300 mg/mL significantly reduced ($p < 0.01$) the number of CFU/mL of *E. cloacae*, with results similar to 0.12% chlorhexidine, while the extracts at 100 and 200 mg/ml did not show the same effectiveness. Regarding the amount of viable DNA from this strain, *E. cloacae* was reduced ($p < 0.05$) in all tested concentrations of *M. recutita* extract and also in chlorhexidine. However, there was no significant difference ($p = 0.565$) in the number of CFU/mL or in the amount of viable DNA ($p = 0.8094$) of *C. albicans* when compared to biofilm without treatment or even between concentrations of the extract when compared among themselves or with 0.12% chlorhexidine.

2.5.2 Anti-inflammatory and healing activity on soft tissues

2.5.2.1 Gingivitis

In 2009, Lucena *et al.* [40] evaluated the anti-inflammatory effect of *M. recutita* and chlorhexidine in patients with chronic gingivitis. In their study, the authors allocated 36 patients to three experimental groups, one using a mouthwash of chamomile extract diluted in 10mL of alcohol in ½ glass of water for each application, another with a mouthwash of 10 mL of 0.12% chlorhexidine, and one group using only brushing associated with flossing. The frequency of substance use was three times a day for one minute, during the entire period of the experiment, being evaluated on the 3rd and 7th days. The authors concluded that the rates of plaque and bleeding decreased significantly from the first to the second assessment in all groups. Chamomile showed efficacy comparable to chlorhexidine in the treatment of chronic gingivitis; however, it should be noted that the clinical presentation of chronic gingivitis can be reduced with oral hygiene guidance, dispensing with the use of chemical control.

A randomized clinical trial was conducted to determine the effectiveness of chamomile mouthwash compared to 0.12% chlorhexidine and a placebo solution (distilled water, 0.02 mg ascorbic acid and mint green tincture) in the treatment of gingivitis in 30 patients from 19 to 25 years of age. The Gingival, Plaque and Bleeding Index were evaluated before the mouthwash, 7 and 15 days after the use of the substances. In their results, the authors observed that both the use of chamomile mouthwash and 0.12% chlorhexidine after 15 days achieved a significant reduction in the rates evaluated compared to the placebo solution, with the difference that patients who used chamomile showed no adverse effects, which are known for long-term use of chlorhexidine, such as dental staining and dysgeusia [13].

Lins *et al.* [14] proposed to clinically evaluate the effect of mouthwash based on chlorhexidine and extracts from the aroeira medicinal plants (*Schinus terebinthifolius*) and chamomile (*M. recutita*) on bacterial plaque and gingivitis through a randomized clinical trial. The study included 59 patients diagnosed with chronic gingivitis seen at the Integrated Clinics of the Department of Dentistry of the State University of Paraíba. The Plaque Index (PI) and the Gingival Bleeding Index (GBI) were used on three occasions, these being on the first day of research, prior to the beginning of the use of the respective mouthwash; on the 7th day after starting treatment with the mouthwash; and on the 15th day after starting treatment with the mouthwash. The patients were instructed to mouthwash twice daily with the solution corresponding to their group, diluted in ½ cup (250mL) of water, 30 minutes after brushing their teeth in the morning and at night, for one minute.

The results of the PI and GBI showed that mouthwash based on mastic extract and chamomile proved to be effective in controlling plaque ($p < 0.001$), as well as in the treatment of chronic gingivitis ($p < 0.001$), with results similar to that of 0.12% chlorhexidine ($p < 0.001$). However, to estimate which

of these was more effective, the difference between the final and the initial moments of each group was calculated, culminating in the gross rate of reduction of the indices, with the chamomile mouthwash showing the greatest reduction in PI (1.03), and aroeira, the smallest reduction (0.70) [14].

In a pilot study with 30 patients carried out at the Federal University of Ceará, Goes *et al.* [15] proposed to evaluate the effects of a mouthwash containing *M. recutita* extract for patients with gingivitis associated with fixed orthodontic appliances. The patients received an oral hygiene kit containing a toothbrush, dental floss and fluoride toothpaste together with a mouthwash bottle that contained either 0.12% chlorhexidine, 1% *M. recutita* extract, or a placebo solution. They were instructed to use 15 mL of the mouthwash solution, 30 minutes after brushing, for one minute in the morning and at night, for 15 days.

In their findings, the authors observed that patients who received mouthwash with chlorhexidine or *M. recutita* exhibited a reduction in dental biofilm ($p = 0.0001$) and gingival bleeding ($p = 0.003$), compared to the placebo group. Both the chlorhexidine and *M. recutita* groups did not differ in relation to the visible PI ($p > 0.05$) and the GBI compared to the placebo group. In addition to these clinical findings, five patients in the chlorhexidine group reported burning or altered taste after 14 days of using the mouthwash, while the *M. recutita* was well tolerated and was not associated with any adverse effects [15].

2.5.2.2 Recurrent mouth ulceration (RMU)

Seyyedi *et al.* [18] conducted a randomized clinical trial to investigate the therapeutic effects of chamomile dye mouthwash in RMU. The authors evaluated patients diagnosed with aphthous lesions between the years 2008 to 2010. Of the 50 research participants, 25 were allocated to the chamomile group and the other 25 to the placebo group, being instructed to apply 10 drops of the solution assigned to them to the oral cavity, three times a day. After application, patients rinsed their mouths using mouthwashes for three minutes. After rinsing their mouth, patients were instructed to abstain from eating any food for half an hour. The patients were examined clinically after 2, 4 and 6 days and, in cases of persistent lesions, they continued to be examined weekly. The duration of healing, the number of lesions observed in each visit, the size of the lesions, possible side effects of the medication, pain and burning were recorded using a visual analog scale (VAS). Patients were instructed not to use any other medication during the study period.

According to the authors, the average number of lesions at the beginning of the study was 2.95 in the chamomile group and 2.67 in the control group, and after 6 days, during the fourth visit, the number was 1.3 in the control group and no lesions were observed in the chamomile group. Regarding pain and burning sensation on the fourth visit, using VAS, it was zero (no pain) in the chamomile

group and 3.4 in the control group, with a statistically significant difference ($p < 0.001$). The authors concluded that the group of patients who used chamomile had an accelerated healing process, since the remission of symptoms was already observed on the second visit. Thus, chamomile proved to be an effective agent for recurrent foot-and-mouth disease, can be used whenever appropriate [18].

2.5.2.3 Oral mucositis

An experimental study conducted in hamsters with the objective of investigating the effect of the topical use of chamomile in the treatment of oral mucositis induced by 5-fluoracil (5-FU), was carried out by Pavesi & collaborators [45]. For this, after inducing oral mucositis (OM) in the animals, the authors compared the absence of treatment (control group), the use of fluid extract of chamomile (Ad-Muc® group), and betamethasone elixir (Celestone® group). The treatment with the tested substances started on day 5, after induction of OM, with application twice a day. The death periods established for the animals were days 0, 2, 5, 8, 10, 12, 14, and 16. The animals that developed OM and were treated with the corticoid exhibited more severe pictures of mucositis, compared to the group treated with chamomile throughout the experiment. Analysis of the results showed that the chamomile group exhibited a lower degree of mucositis over the evaluation period compared to the control and corticoid groups. The authors concluded that chamomile proved to be effective in the treatment of OM in the model under study.

In Curitiba, Paraná (Brazil), 23 patients were included in a study [46] that evaluated the evolution of OM in cancer patients treated by the palliative care service, after intervention and medical and nutritional guidance. After inspecting the oral cavity and classifying the degree of OM that these patients had, they answered questionnaires about food, medications in use, oral complaints and lifestyle habits. The interviews were conducted at the first appointment and after 15 days. The nutritional intervention was carried out for all patients, indicating that they mouthwash with cold, industrialized chamomile tea, three times a day; avoid very acidic, dry, hard or spicy foods; restrict salt; avoid very hot food or preparations. Medical conduct was determined individually, considering the diagnosis of the disease and the symptoms presented by each patient. The authors found that on return, after 15 days of using the mouthwash with chamomile and nutritional guidelines, 73.9% of the patients did not have OM, and of these, 64.7% reported not having restrictions regarding the consistency of the diet. Grade I mucositis was found in 13% of patients, with normal food intake. Grade II mucositis was present in 8.6% of the patients, of which 50% reported eating liquid foods and 50% consuming foods of any consistency. Grade III mucositis was present in 4.3% of the cases studied, with 100% of these referring to ingestion of pasty foods. There was no detection of grade IV mucositis in the reassessment [46].

In 2016, Tavakoli Ardakani *et al.* [11] investigated the effects of *M. recutita* associated with *Mentha piperita* on OM in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) between the years 2011 and 2012. Sixty patients undergoing HSCT were randomly distributed in two groups: placebo (n = 33), containing 0.02% w/v (percentage volume by volume) edible red color, 0.5% v/v (percentage by volume) color chlorophyllin, 13% v/v ethanol at 96 degrees, and 71.5% v/v of sterile distilled water; and a mouthwash group, based on medicinal herbs (n = 27), containing 1% v/v peppermint oil, dry extract of 1% w/v *M. recutita*, and 99% v/v ethanol at 96 degrees. All patients received the mouthwash one week before HSCT and were instructed to use it three times a day for at least 30 seconds and to avoid eating, drinking any fluids or mouthwash for up to 30 minutes after using the mouthwash.

In their results, the authors observed that the maximum duration and the established average daily degree of OM were significantly reduced in the treatment group ($p < 0.05$). The use of herbal mouthwash led to significant improvements in pain intensity ($p = 0.009$), dry mouth feeling ($p = 0.04$), and dysphagia ($p = 0.009$). Other significant results included a reduction in the use of complementary drugs ($p = 0.03$), narcotic analgesics ($p = 0.047$), total parenteral nutrition (TPN) ($p = 0.02$), and the duration of TPN ($p = 0.03$). The authors concluded that patients who received the herbal mouthwash, including chamomile, had fewer complications and symptoms associated with OM [11].

In addition to the aforementioned studies, in 2018 other authors [12] published a systematic review on the effects of *M. recutita* in the treatment of OM. In their literature search, the authors found 21 papers that addressed this topic, 10 studies in animals and 11 in humans, with the beneficial effects of chamomile being significant in all the investigated species. In the included studies, the authors described mouthwash, topical and oral use formulated as infusion, orabase and gel as forms of administration of chamomile. Regarding the duration of the intervention, the articles that reported the time of use varied from 5 to 30 days of consecutive use. Thus, the authors concluded that the use of this herbal medicine is a promising alternative in the treatment of OM, although the protocol for using this type of therapy is still not well established in the literature.

2.5.3 Action on mineralized tissues

Taking into account the known anti-inflammatory capacity of *M. recutita* on the soft tissues of the oral cavity, an experimental study with 76 rats evaluated the effects of chamomile on inflammatory response and alveolar bone resorption. In their experiment, the authors used a *nylon* suture ligature (3-0) positioned on the cervical of the left upper second molar, in a subgingival position on the palatal side and supragingival on the buccal side. The animals were allocated into four groups that received Tween® 80, a non-ionic detergent, or *M. recutita* extract at 10, 30 and 90 mg/kg per gavage, 30 minutes before placing the bandage and daily until the 11th day, when the animals were killed. The

nylon thread around the upper second molar induced significant alveolar bone resorption from the 3rd day of ligation, reaching a maximum between days seven and eleven [19].

According to the authors, the eleven days of ligature-induced bone resorption resulted in leukocyte infiltration and an increase in pro-inflammatory factors such as TNF- α and IL-1. However, the use of *M. recutita* extract significantly prevented ($p < 0.05$) the elevation of these interleukins, in addition to not causing changes in the organs or body weight of the animals. Thus, they concluded that *M. recutita* extract was able to prevent inflammation and alveolar bone resorption, reducing TNF- α and IL-1 β , preventing osteoclast activation, without interfering with bone anabolism [19].

2.5.4 Xerostomia

A clinical trial conducted in 2016 by Morales-Bozo *et al.*[9] included 74 elderly patients, with the goal of determining the effectiveness of a natural saliva substitute, based on *M. recutita* and linseed, to relieve xerostomia, compared to the substitute of conventional saliva. The substitute for natural saliva was made from an infusion of 30 g of flaxseed and 1 g of chamomile in one liter of water, the seeds being removed through filtration, while a commercial agent based on carboxymethyl cellulose was used as the substitute for conventional saliva (2 mL, four times a day each). At the beginning of the experiment, the baseline data for the xerostomia of the participants was determined through the Fox survey, which assesses the degree of intensity of the xerostomia symptoms using a visual analog scale to assess its severity. In their results, the authors observed that the saliva substitute based on medicinal herbs promoted greater relief of dry mouth symptoms, a sensation of thick saliva and difficulty in swallowing compared to the conventional substitute ($p < 0.05$)

2.5.5 Burning Mouth Syndrome

A report of two clinical cases of female patients, Caucasian, aged 68 and 59, with a burning mouth complaint, whose most affected areas were lips and tongue, both diagnosed with Burning Mouth Syndrome (BMS) was described in the literature. Both patients had high degrees of pain according to the VAS, with the first at degree 8 and the second at degree 9. The treatment proposed for both included ingesting a large volume of water and rinsing with unsweetened chamomile tea. It was advised that the tea be kept in the mouth for three minutes, four times a day, in association with cognitive therapy. During the reassessment, after 14 days, both reported a significant reduction in the burning sensation and improvement in general well-being. The new appointment on the VAS was 4 for the first patient described and 3 for the second. The established therapy was continued for one year, with visits every 15 days in the first two months, and monthly thereafter. According to the

authors, taking into account the results achieved with the described cases, the use of chamomile mouthwash associated with cognitive therapy proved to be promising in the treatment of BMS [47].

FINAL CONSIDERATIONS

There is a growing demand in the world market for *M. recutita*, due to the increased consumption of natural elements and due to the extensive medicinal values and pharmacological properties of this plant. The benefits of using herbal medicines include fewer side or toxic effects, facility to obtain, low cost and the possibility of them generating income for their producers. Studies show the effectiveness and advantages of using *M. recutita* in relation to allopathic drugs in the various pathological conditions that affect the oral cavity.

It is known that *M. recutita* has an antimicrobial, anti-inflammatory, healing action, among others. It is important that dental surgeons know the possible actions and benefits of this medicinal herb, as well as its possible formulations so that they can use it in their dental practice.

Conflict of Interest statement: The authors declare that there are no conflicts of interest.

REFERENCES:

1. S. Miraj, S. Alesaeidi, 2016. A systematic review study of therapeutic effects of Matricaria recutita chamomile (chamomile), Electronic Physician. 8(9), 3024-3031. <http://dx.doi.org/10.19082/3024>
2. O. Isaac, H. Schimpke, 1965. Alte and Erkenntnisse der Kamillenforschung 2. Mitt. Dstch Pharmaz Ges. 35, 133-147.
3. O. Singh, Z. Khanam, N. Misra, M.K. Srivastava, 2011. Chamomile (Matricaria chamomilla L.): An overview. Pharmacogn Reviews. 5(9):82-95. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.79103>
4. D.L. McKay, J.B. Blumberg, 2006. A Review of the Bioactivity and Potential Health Benefits of Chamomile Tea (Matricaria recutita L.) Phytother Res. 20, 519-530. <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.1900>
5. Y.K.R. Ríos, A.C.J. Otero, D.L.H. Muñoz, M.R. Echeverry, S.M.R. Robledo, M.A.C. Yepes, 2008. Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (Matricaria chamomilla) Rev Colomb Cienc Quím Farm. 37(2), 200-211.
6. J.K. Srivastava, E. Shankar, S. Gupta, 2010. Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. Mol Med Report. 3(6):895-901. <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2010.377>
7. H. Lorenzi, F.J.A. Matos, 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. SP: Instituto Plantarum, Nova Odessa. 396p.
8. M.A. Pequeno, M.R. Silvestre, I. Amêndola, C.R.G. Silva, M.V.P. Leão, S.S.F. Santos, 2018. Matricaria Recutita Extract (Chamomile) to Reduce Candida Albicans and Entrobacter Cloacae Biofilms: in vitro study. RGO, Rev Gaúch Odontol. 66(2):00-00. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-863720180002000033328>
9. I. Morales-Bozo, A. Ortega-Pinto, G. Rojas Alcayaga, J.P. Aitken Saavedra, O. Salinas Flores, C. Lefimil Puente, et al, 2016. Evaluation of the effectiveness of a chamomile (Matricaria

- chamomilla) and linseed (*Linum usitatissimum*) saliva substitute in the relief of xerostomia in elders. *Gerodontology*. 34:42-8. <http://dx.doi.org/10.1111/ger.12220>.
10. E.M. Schirmer, A. Ferrari, L.C.T. Trindade, 2012. Oral mucositis evolution after nutritional intervention in cancer patients under palliative care. *Rev Dor*. 13(2):141-6
 11. M. Tavakoli Ardakani, S. Ghassemi, M. Mehdizadeh, F. Mojab, J. Salamzadeh, S. Ghassemi, A. Hajifathali, 2016. Evaluating the effect of *Matricaria recutita* and *Mentha piperita* herbal mouthwash on management of oral mucositis in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation: A randomized, double blind, placebo controlled clinical trial. *Complement Ther Med*. 29:29-34. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2016.08.001>
 12. V.T.S. Gomes, R.N.S. Gomes, M.S. Gomes, W.M. Joaquim, E.C. Lago, R.A. Nicolau, 2018. Effects of *Matricaria Recutita* (L.) in the Treatment of Oral Mucositis *Scient Worl J*. 1-8. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/4392184>
 13. F.M.J. Gaete, M.P. Oliva, 2010. Efectividad del colutorio de manzanilla comparado con placebo y clorhexidina en pacientes con gingivitis entre 19 y 25 años: ensayo clinico controlado. *Int J Odontostomat*.6(2):151-156.
 14. R. Lins, F.H.P. Vasconcelos, R.B. Leite, R.S. Coelho-Soares, D.N. Barbosa, 2013. Avaliação clínica de bochechos com extratos de Aroeira (*Schinus terebinthifolius*) e Camomila (*Matricaria recutita* L.) sobre a placa bacteriana e a gengivite. *Rev Bras Pl Med*. 15:112-120.
 15. P. Goes P, C.S. Dutra, M.R.P. Lisboa, D.V. Gondim, R. Leitão, G.A.C. Brito, R.O. Rego, 2016. Clinical efficacy of a 1% *Matricaria chamomile* L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. *J Oral Sci*. 58(4):569-574.
 16. A.C.L. Albuquerque, M.S.V. Pereira, J.V. Pereira, M.R.M. Costa, L.F. Pereira, J.S. Higino, 2010. Antimicrobial Effect of *Matricaria recutita* Linn. (Chamomile) Extract against Dental Biofilm Microorganisms. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr*. 10(3):451-455. <http://dx.doi.org/10.4034/1519.0501.2010.0103.0018>
 17. H. Rahman, A. Chandra, 2015. Microbiologic evaluation of *matricaria* and chlorhexidine against *E. faecalis* and *C. albicans*. *Indian J Dent*. 6(2):60-64. <http://dx.doi.org/10.4103/0975-962X.155876>
 18. S.A. Seyyedi, M. Sanatkhani, A. Pakfetrat, P. Olyae, 2014. The therapeutic effects of chamomilla tincture mouthwash on oral aphthae: A Randomized Clinical Trial. *J Clin Exp Dent*. 6(5):e535-8. Doi:10.4317/jced.51472 <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51472>
 19. M.V. Guimarães, I.M. Melo, V.M.A. Araújo, V.T. Deizy Wong, C.S.R. Fonteles, L.K.A. Leal et al, 2016. Dry Extract of *Matricaria Recutita* L. (Chamomile) Prevents Ligature-Induce Alveolar Bone Resorption in Rats via Inhibition of TNF- α and IL-1 β . *J Periodontol*. 87(6):1-17. <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2016.150411>
 20. J.A. Astin, K.R. Pelletier, A. Marie, W.L. Haskell, 2000. Complementary and Alternative medicine use among elderly persons: One year analysis of Blue Shield medicare supplement. *J Gerontol*. 55:M4-M9.
 21. E.R. Martins, D.M. Castro, D.C. Castellani, J.E. Dias, 2003. *Plantas Mediciniais*. Universidade Federal de Viçosa. 220p.
 22. H. Sebai, M.A. Jabri, A. Souli, K. Hosni, K. Rtibi, O. Tebourbi, et al, 2015. Chemical composition, antioxidant properties and hepatoprotective effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) decoction extract against alcohol-induced oxidative stress in rat. *Gen Physiol Biophys*. 34:263-275 http://dx.doi.org/10.4149/gpb_2014039
 23. I.Z. Matic, Z. Jurani, K. Savikin, G. Zduni, N. Navinski, D. Goevac, 2013. Chamomile and marigold tea. chemical characterization and evaluation of anticancer activity. *Phytother Res*. 27:852-858.
 24. ANVISA. <http://gg.gg/anvisa-camomila>, 2018 (accessed 12 december 2018).
 25. C.H. Franz, R. Bauer, R. Carle, D. Tedesco, A. Tubaro, K. Zitterl-Eglseer, 2005. Study on the assessments of plants/herbs, plant/ herb extracts and their naturally or synthetically produced components as additives for use in animal production. CFT/ EFSA/FEEDAP/2005/01. 155-69.
 26. P. Satyal, S. Shrestha, W.N. Setzer, 2015. Composition and Bioactivities of an (E)- β -Farnesene Chemotype of Chamomile (*Matricaria chamomilla*) Essential Oil from Nepal. *Nat Prod Communicat*. 10(8):1453 -1457.

27. K.G. Torres, 2018. Desenvolvimento de nanogel de quitosana ligada ao ácido diidrocafeico para encapsulação do óleo essencial de *Matricaria recutita*. Monografia. São João del-Rei: Universidade Federal de São João del-Rei.
28. E. Lemberkovics, A. Kéry, G. Marczal, B. Simándi, E. Szöke, 1998. Phytochemical evaluation of essential oils, medicinal plants and their preparations. *Acta Pharm Hung.* 68:141–149.
29. L. De Martino, F. Nazzaro, E. Mancini, V. De Feo, In: Preedy VR, Watson RR. *Essential oils from Mediterranean Aromatic Plants, The Mediterranean Diet: An Evidence-Based Approach*, Londres, Elsevier, 2014 pp.649-661.
30. R.K. Lima, M.G. Cardoso, 2007. Lamiaceae Family: Important Essential Oils with Biological and Antioxidant Activity. *Rev Fitos.* 3(3):14-24.
31. D.S. Santos, M.M.F. Rodrigues, 2017. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. *Est Cient. (UNIFAP).* 7(3):29-35. <http://dx.doi.org/10.18468/estcien.2017v7n3.p29-35>.
32. C. Mann, E.J. Staba, 2002. The chemistry, pharmacology and commercial formulations of chamomile. In: Craker LE, Simon JE, editors. *Herbs, spices and medicinal plants - recent advances in botany, horticulture and pharmacology*. USA: Haworth Press Inc. 235–80.
33. K.E. Czelusniak, A. Brocco, D.F. Pereira, G.B.L. Freitas, 2012. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. *Rev Bras Pl Med.* 14(2):400-409.
34. S.J. Correia, J.M. David, E.P. Da Silva, J.P. David, L.M.X. Lopes, L.M.S. Guedes, 2008. Flavonóides, norisoprenóides e outros terpenos das Folhas de *Tapirira guianensis*. *Quím Nova.* 31(8):2056-2059.
35. M.K. Bedi, P.D. Shenefelt, 2002. Herbal therapy in Dermatology. *Arch Dermat.* 138(2):232-42.
36. O. Isaac, 1979. Pharmacological investigations with compounds of *Chamomilla*. *Planta Med.* 35:118-24.
37. W. Vermerris, R. Nicholson, *Phenolic Compound Biochemistry*, Springer Science & Business Media, 2007, Chap. I:1-2.
38. V. Gupta, P. Mittal, P. Bansa, S.L. Khokra, D. Kaushik, 2010. Pharmacological potential of *Matricaria recutita*-A review. *Int J Pharm Sci Drug Res.* 2:12-6.
39. E.E. Mazokopakis, G.E. Vrentzos, J.A. Papadakis, D.E. Babalis, E.S. Ganotakis, 2005. Wild chamomile (*Matricaria recutita* L.) mouthwashes in methotrexate-induced oral mucositis. *Phytomed.* 12:25–27.
40. R.N. Lucena, R.D.A.U. Lins, I.N.C. Ramos, A.L. Cavalcanti, R.C.B. Gomes, M.A.S. Maciel, 2009. Comparative clinical evaluation of the antiinflammatory efficacy of *Matricaria recutita* and chlorhexidine in patients with chronic gingivitis. *Rev Bras Pesq Saú.* 11(3):31-36
41. N. Hamon, *Herbal medicine. The Chamomiles*. *Can Pharm J.* 1989.
42. A. Vieira, M.A. Guimarães, G.Q. David, I.V. Karsburg, A.N.R. Campos, 2009. Efeito genotóxico da infusão de capítulos fl orais de camomila. *Rev Trópica Ciên Agrár Biol.* 3(1):8-13.
43. K. Pirali-Kheirabadi, M. Razzaghi-Abyaneh, 2007. Biological activities of chamomile (*Matricaria chamomile*) flowers' extract against the survival and egg laying of the cattle fever tick (*Acari Ixodidae*). *J Zhejiang Univ Sci B.* 8(9):693-696
44. O.V. Cárcamo, M.P. Oliva, C.P. González, 2011. Efectividad antimicrobiana del colutorio de *Matricaria recutita*, em funcionarios de la Facultad de Odontolog.a de la Universidad del Desarrollo, Chile *Int J Odontostomat.* 5(2):179-184.
45. V.C.S. Pavesi, T.C.C. Lopez, M.A.T. Martins, M. Sant'Ana Filho, S.K. Bussadori, K.P.S. Fernandes, et al, 2011. Healing action of topical chamomile on 5-fluouracil induced oral mucositis in hamster. *Sup Care Can.* 19:639–646. <http://dx.doi.org/10.1007/s00520-010-0875-0>
46. E.M. Schirmer, A. Ferrari, L.C.T. Trindade, 2012. Oral mucositis evolution after nutritional intervention in cancer patients under palliative care. *Rev Dor.* 3(2):141-6.
47. A.M.C. Milani, C.L.R. Macedo, M.C. Bello, C.A. Klein Júnior, R.B. dos Santos, 2018. A successful approach to conrol burning mouth syndrome using *matricaria recutita* and cognitive therapy. *J Clin Exp Dent.* 10(5):e499-501. <http://dx.doi.org/10.4317/jced.54686>

APÊNDICE B - Ficha de análise morfométrica aplicada para coleta de dados do Artigo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
 LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ORAL - LBO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS - PPGPIOS

ANÁLISE MORFOMÉTRICA – MUCOSA JUGAL

Trabalho: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA ORAL NORMAL DE RATOS
 SUBMETIDA À APLICAÇÃO TÓPICA DE CAMOMILA (*Matricaria recutita*)

Orientadora: Gabriela Botelho Martins
 Doutoranda: Tila Fortuna

| LÂMINA: | ÁREA 1 Medida μm Data: | ÁREA 2 Medida μm Data: | ÁREA 3 Medida μm Data: |
|---|---|---|---|
| Distância da camada basal à superfície epitelial | ----- | ----- | ----- |
| 1º ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º ponto | | | |
| Média | | | |
| Distância do ápice da papila dérmica para superfície epitelial | ----- | ----- | ----- |
| 1º ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º ponto | | | |
| Média | | | |
| Largura da papila dérmica | ----- | ----- | ----- |
| 1º ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º ponto | | | |
| Média | | | |
| Distância interpapilar | ----- | ----- | ----- |
| 1º ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º ponto | | | |
| Média | | | |
| Espessura da ceratina | ----- | ----- | ----- |
| 1º ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º ponto | | | |
| Média | | | |

APÊNDICE C - Ficha da análise morfométrica do colágeno aplicada para coleta de dados do Artigo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
 LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ORAL - LBO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS - PPgPIOS

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO COLÁGENO - MUCOSA JUGAL

Trabalho: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA ORAL NORMAL DE RATOS SUBMETIDA À APLICAÇÃO TÓPICA DE CAMOMILA (*Matricaria recutita*)

Orientadora: Gabriela Botelho Martins

Doutoranda: Tila Fortuna

| Lâmina: | ALTURA | COMPRIMENTO | ÁREA LÂMINA | TOTAL TECIDUAL | APENAS COLÁGENO |
|---------|--------|-------------|-------------|----------------|-----------------|
| ÁREA 1 | | | | | |
| ÁREA 2 | | | | | |
| ÁREA 3 | | | | | |

APÊNDICE D – Ficha da análise morfológica aplicada para coleta de dados do Artigo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
 LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ORAL - LBO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS - PPGPIOS

Parâmetros de avaliação morfológica da mucosa jugal

Trabalho: AVALIAÇÃO HISTOMORFOMÉTRICA DA MUCOSA ORAL NORMAL DE RATOS
 SUBMETIDA À APLICAÇÃO TÓPICA DE CAMOMILA (*Matricaria recutita*)

Orientadora: Gabriela Botelho Martins

Doutoranda: Tila Fortuna

Lâmina: ____ Ausente (0) Discreta (+) Moderada (++) Intensa (+++)

Parâmetro:

| | | | | |
|---|--|--|--|--|
| Hiperkeratose | | | | |
| Acantose | | | | |
| Degeneração da camada basal epitelial | | | | |
| Infiltrado poli ou monomorfo | | | | |
| Edema | | | | |
| Deposição colágeno | | | | |

APÊNDICE E - Ficha da análise morfológica das secções em HE aplicada para coleta de dados do Artigo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
 LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ORAL - LBO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS - PPGPIOS

Avaliação morfológica – língua de ratos

Trabalho: AVALIAÇÃO DA TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER ASSOCIADA À *MATRICARIA RECUTITA* NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS

Orientadora: Gabriela Botelho Martins

Doutoranda: Tila Fortuna

| PARÂMETRO | LÂMINA: | | | |
|---------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| | AUSENTE | DISCRETO | MODERADO | SEVERO |
| Celularidade tec.(fibroblastos) | | | | |
| Deposição de colágeno | | | | |
| Edema | | | | |
| Hiperemia | | | | |
| Neoangiogênese | | | | |
| Infiltrado inflamatório | | | | |
| Predominância inf. Inflam. | Polimorfo () | | Monomorfo () | |
| Reepitelização | Completa | | Parcial | Ausente |
| | Organizada | Desorganizada | | |
| Fotografar () Estrutura: | OBS: | | | |

APÊNDICE F - Ficha da análise morfométrica das secções em HE aplicada para coleta de dados do Artigo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
 LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ORAL - LBO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS - PPGPIOS

Avaliação morfométrica – língua de ratos

Trabalho: AVALIAÇÃO DA TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER ASSOCIADA À MATRICARIA RECUTITA NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS

Orientadora: Gabriela Botelho Martins

Doutoranda: Tila Fortuna

| Lâmina: | Borda 1 | Borda 2 | Centro |
|-----------------------------|---------|---------|--------|
| DCBSE (TOTAL) | | | |
| 1º Ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º Ponto | | | |
| Média | | | |
| EC (CERATINA) | | | |
| 1º Ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º Ponto | | | |
| Média | | | |
| DCBCE (SEM CERATINA) | | | |
| 1º Ponto | | | |
| 2º ponto | | | |
| 3º Ponto | | | |
| Média | | | |

APÊNDICE G – Ficha da análise morfológica das secções coradas com Sírius Vermelho aplicada para coleta de dados do Artigo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ORAL - LBO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS - PPGIOS

Avaliação morfológica do colágeno – língua de ratos

Trabalho: AVALIAÇÃO DA TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER ASSOCIADA À *MATRICARIA RECUTITA* NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS

Orientadora: Gabriela Botelho Martins

Doutoranda: Tila Fortuna

| LÂMINA: | | |
|--|-------------------------|----------------------------|
| ORGANIZAÇÃO TECIDUAL - SEGUE PADRÃO DE NORMALIDADE? | SIM | NÃO |
| ESPESSURA DA FIBRA | DELICADAS (MAIS ROSADA) | ESPESSA (MAIS AVERMELHADA) |
| PADRÃO DE ALONGAMENTO DAS FIBRAS | FRAGMENTADA | NÃO FRAGMENTADA |
| PROFUNDIDADE (DA CAMADA BASAL AO TECIDO MUSCULAR) | AUMENTADA | NORMAL |

APÊNDICE H – Ficha da análise morfométrica das secções coradas com Sírius Vermelho aplicada para coleta de dados do Artigo 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - UFBA
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
 LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA ORAL - LBO
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS INTERATIVOS DOS ÓRGÃOS E SISTEMAS - PPeIOS

Avaliação morfométrica do colágeno – língua de ratos

Trabalho: AVALIAÇÃO DA TERAPIA DA FOTOBIMODULAÇÃO LASER ASSOCIADA À *MATRICARIA RECUTITA* NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS

Orientadora: Gabriela Botelho Martins

Doutoranda: Tila Fortuna

| Lâmina: | ALTURA | COMPRIMENTO | ÁREA LÂMINA | TOTAL TECIDUAL | APENAS COLÁGENO |
|---------|--------|-------------|-------------|----------------|-----------------|
| BORDA 1 | | | | | |
| BORDA 2 | | | | | |
| CENTRO | | | | | |

ANEXOS

ANEXO A – Carta de Anuência do Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



CARTA DE ANUÊNCIA

Eu, "**REJANE CONCEIÇÃO SANTANA**", na qualidade de responsável pelo(a) "**BIOTÉRIO DO LABORATÓRIO DE NEUROCIÊNCIAS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**", autorizo a realização da pesquisa intitulada "**EFEITO DA CAMOMILA NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS**", cujo objetivo é avaliar o efeito da *Chamomilla Recutita (L.)* na cicatrização de ferida cirúrgica em língua de ratos, a ser conduzida sob a responsabilidade do pesquisador "**GABRIELA BOTELHO MARTINS E EQUIPE**"; e DECLARO que o mesmo apresenta infraestrutura necessária à realização da referida pesquisa.

Salvador, 03 de abril de 2018.

Profa. Dr.ª. Rejane Conceição Santana

Coordenadora do Biotério do Laboratório de Neurociências – ICS/UFBA

ANEXO B - Carta de Anuência do Laboratório de Bioquímica Oral do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Departamento de Bioquímica e Biofísica
Laboratório de Bioquímica Oral



TERMO DE ANUÊNCIA

Declaro para os devidos fins que o Laboratório de Bioquímica Oral está de acordo com a execução do projeto "EFEITO DA CAMOMILA NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS", coordenado pela professora **Gabriela Botelho Martins** e assume o compromisso de apoiar o desenvolvimento da referida pesquisa nesta Instituição durante a realização da mesma.

Esta instituição está ciente de suas co-responsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso dispondo de infra-estrutura necessária para a execução do mesmo, cumprindo as Resoluções Éticas, em especial a Resolução 466/2012 do CNS.

Salvador, 03 de Abril de 2018

Elisângela de Jesus Campos

Profa. Adjunto de Bioquímica
Coordenadora do Laboratório de Bioquímica Oral
Departamento de Bioquímica e Biofísica
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia
Campus do Canela

Laboratório de Bioquímica Oral/ Sala 400 – Instituto de Ciências da Saúde da UFBA
Av. Reitor Miguel Calmon, s/n – Vale do Canela, Campus do Canela,
Tel. (71) 3283-8891 - CEP: 40160-100 – Salvador – Bahia – Brasil

ANEXO C - Parecer do CEP do Instituto de Ciência da Saúde (ICS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).



Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências da Saúde - UFBA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CAMOMILA NA CICATRIZAÇÃO DA MUCOSA ORAL DE RATOS", protocolada sob o CEUA nº 3562050618, sob a responsabilidade de **Gabriela Botelho Martins e equipe; Tila Fortuna Costa; Juliana Borges de Lima Dantas; Rejane Conceição Santana; Gabriela Botelho Martins; Roberto Paulo Correia de Araújo** - 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 da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde) (CEUA/ICS.UFBA) na reunião de 29/09/2018.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE EFFECT OF CAMOMILE IN THE HEALING OF ORAL MUCOSUS OF RATS", utilizing 108 Heterogenics rats (108 males), protocol number CEUA 3562050618, under the responsibility of **Gabriela Botelho Martins and team; Tila Fortuna Costa; Juliana Borges de Lima Dantas; Rejane Conceição Santana; Gabriela Botelho Martins; Roberto Paulo Correia de Araújo** - 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 Bahia (Health Sciences Institute) (CEUA/ICS.UFBA) in the meeting of 09/29/2018.

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

Vigência da Proposta: de **09/2018 a 09/2019** Área: **Ciências da Saúde**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **60 a 90 dias**

N: **108**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 300 g**

Local do experimento: O procedimento cirúrgico e os procedimentos de aplicação das medicações, bem como as aplicações do laser serão realizados em sala específica para manipulação de animais no Laboratório de Neurociências do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA. As análises das lâminas confeccionadas após a morte dos animais acontecerão no Laboratório de Bioquímica Oral do ICS/UFBA.

Salvador, 02 de outubro de 2018

Dra. Luciana Lyra Casais-e-Silva

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

MSc. Marcos Borges Ribeiro

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Bahia (Instituto de Ciências da Saúde)

ANEXO D – Comprovante de submissão do Artigo 1 para apreciação pelos revisores.

ALTERNATIVE THERAPIES

IN HEALTH AND MEDICINE

Submitting Manuscripts/Manuscript Processing

All manuscripts must be submitted electronically to athmsubmissions@innovisionhm.com. They are usually acknowledged and assigned a manuscript number within a week of receipt in our office. The manuscript number should be used in all future communications with InnoVision Health Media.

Include your mailing address, phone number, and fax number in your e-mail message as well as an electronic version (Microsoft Word preferred) of each item listed in the checklist below. Tables and figures should be included as attachments if possible. If they cannot be sent as attachments, please send a high-quality hard copy by post.

Manuscripts should be submitted as a series of files including a cover letter, the manuscript (including title page, the abstract, manuscript text, and references), and all tables, figures, and legends. Please submit a signed copy of the [copyright transfer form](#). Most submissions are subject to peer review (see details below). Presentation of data at scientific meetings does not preclude submission.





Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós Graduação
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100
Salvador, Bahia, Brasil

<http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br>