

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA INTEGRADA**

BRUNA BENSO

**ESTUDO DO EFEITO DA *Malva sylvestris* EM FIBROBLASTOS ESTIMULADOS
POR LPS**

**PONTA GROSSA
2012**

BRUNA BENSO

**ESTUDO DO EFEITO DA *Malva sylvestris* EM FIBROBLASTOS ESTIMULADOS
POR LPS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia - Área de concentração em Clínica Integrada.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki.

**PONTA GROSSA
2012**

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

B474e Benso, Bruna
Estudo do efeito da *Malva sylvestris* em fibroblastos estimulados por LPS / Bruna Benso. Ponta Grossa, 2012.
68f.
Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de concentração : Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientador : Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

1. *Malva sylvestris*. 2. Doença periodontal. 3. Inflamação.
I. Otuki, Michel Fleith. II. T.

CDD : 617.6

BRUNA BENSO

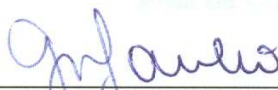
**ESTUDO DO EFEITO DA *Malva sylvestrys* EM FIBROBLASTOS ESTIMULADOS
POR LPS**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Curso de Mestrado em Odontologia - Área de concentração em Clínica Integrada.

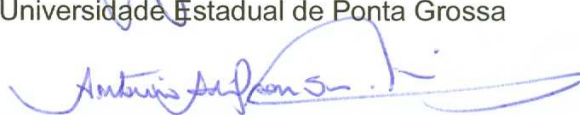
Ponta Grossa, 28 de fevereiro de 2012.



Prof. Dr. Michel Fleith Otuki – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Giovanni Marino Fávero
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Antonio Adilson Soares de Lima
Universidade Federal do Paraná

DADOS CURRICULARES

Bruna Benso

NASCIMENTO 08.04.1988

Medianeira-Pr

FILIAÇÃO

Luiz Carlos Benso

Rosecleide Benso

2006-2009

Curso de Graduação em Odontologia pela
(UNIPAR)-Universidade Paranaense- Campus
Cascavel

2009

Curso de Aperfeiçoamento em Prótese fixa-
ABO- Regional de Cascavel-PR

2010-2012

Curso de Pós-Graduação em Odontologia,
Universidade Estadual de Ponta Grossa-
UEPG, nível de Mestrado em Odontologia-
Área de Concentração: Clínica Integrada

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.

Charles Chaplin

À Deus, pela proteção e bondade, por iluminar a minha vida e se mostrar sempre presente.

Aos meus pais, que me guiaram e educaram com todo o seu amor e carinho. Agradeço pelo incentivo contínuo e pelo grande exemplo de força e superação. Amo vocês!

A toda a minha família que participa, apoia e vive de forma incondicional todas as minhas batalhas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador pela forma como conduz seus trabalhos. Admiro a sua competência e principalmente a paciência que tornou possível meu aprendizado.

Aos alunos de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da UFPR que contribuíram neste trabalho: Graziela, Luise e principalmente o Arthur. Sou imensamente grata!

À Coordenação do curso de Mestrado, pela forma humana e competente como conduz as atividades.

À todos os professores do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia da UEPG que, de alguma forma, contribuíram para minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos meus colegas de curso com quem muito aprendi e dividi dificuldades ao longo desses dois anos de Mestrado.

Ao Marcelo pela companhia e incansáveis palavras de incentivo ao longo destes dois anos.

À todos os meus amigos que fizeram meus dias melhores.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) do Ministério da Educação e Cultura, pelo apoio financeiro para a realização deste Mestrado.

A todos que de alguma forma contribuíram para existência desse trabalho.

RESUMO

BENSO B. Estudo do efeito da *Malva sylvestris* em fibroblastos estimulados com LPS. [Dissertação] Mestrado em Clínica Integrada Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2012.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um biomonitoramento do extrato hidroalcóolico da *Malva sylvestris* (EHM), avaliar o perfil fitoquímico além do efeito do extrato hidroalcóolico da planta sobre a liberação de IL-1 β , TNF- α , NO induzido por LPS e por fim, verificar possíveis efeitos toxicológicos do extrato. A atividade das várias formas extratoras (Soxhlet, Maceração, Turbólise e Infusão) foram testadas através do modelo de edema de orelha em camundongos induzido por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) e posteriormente avaliado qual concentração etanólica apresentou maior atividade anti-edematogênica. As análises de ESI-MS e LC-ESI-MS foram realizadas para explorar os íons representativos dos padrões de malvidin 3-glucosídeo, quercetina e escopoletina. Em ensaio *in vitro* fibroblastos provenientes do banco de células, linhagem 3T3, foram cultivados em meio de cultura completo Dulbecco Mem (DMEM). As células foram analisadas para testes experimentais após quatro passagens. A estimulação com LPS em fibroblastos 3T3 ocasionou um aumento na produção de Óxido Nítrico liberado no sobrenadante de cultura de células, para quantificação de óxido nítrico foi utilizado o método baseado no uso de sonda fluorogênica (DAF-FM DA). Após sensibilização com LPS, a liberação de, IL-1 β e TNF- α foram quantificadas, e posteriormente foram avaliadas separadamente através do método de ELISA. Para o ensaio de identificação de substâncias com atividade genotóxica foi utilizado o Ensaio do Cometa através da técnica de eletroforese em microgel. Os resultados demonstraram que as três formas extratoras na maior dose testada (3.0 μ g/ml) do (EHM) foram capazes de reduzir o edema de orelha em 44- 46% e que o extrato da malva na concentração etanólica de 100% alcançou maior inibição (50,69%). Nos ensaios *in vitro*, o tratamento com o extrato hidroalcóolico foi capaz de impedir a formação de Óxido Nítrico em $80 \pm 14\%$ na maior concentração utilizada em comparação ao grupo Controle, e a concentração de 1,0 μ g/ml foi capaz de inibir $86 \pm 2\%$ os níveis de IL-1 β . Os níveis de TNF – α foram reduzidos em $84 \pm 4\%$. O (EHM) obtido pelo método de maceração na concentração de 100% sugere o potencial anti-inflamatório por via tópica em modelo de inflamação de pele, em avaliação em cultura de células sugere a interferência do extrato nas citocinas IL-1 β e TNF- α , o que gera necessidade de outras metodologias a fim de investigar o mecanismo celular e molecular sobre a qual a planta exerce o efeito anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Malva sylvestris*. Doença periodontal. Inflamação.

ABSTRACT

BENSO B. Study of the effect of *Malva sylvestris* in fibroblasts stimulated with LPS. [Dissertation] MA in Integrated Clinical Practice: State University of Ponta Grossa, 2012.

The objective of this study was to develop biomonitoring of the hydroalcoholic extract of *Malva sylvestris* to evaluate the phytochemical profile beyond the effect of the hydroalcoholic extract of the plant on the release of IL-1 β , TNF- α , LPS-induced nitric oxide, and finally, to assess possible toxicological effects of the extract. The activity of the various forms of extraction (soxhlet, maceration, turbolise and infusion) were tested using the ear edema model in mice, induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) and subsequently evaluated to determine which ethanol concentration presented the most anti-edematous activity. ESI-MS and LC-ESI-MS analyses were performed to exploit the ions that were representative of patterns of malvidin 3-glucoside, quercetin and scopoletin. Using *in vitro* tests, fibroblasts from the stock cell line 3T3 were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM). The cells were analyzed by experimental tests after four passages. Stimulation with LPS in 3T3 fibroblasts resulted in an increased production of nitric oxide released in the cell culture supernatant. A method based on the use of fluorogenic probe (DAF-FM DA) was used to quantify the amount of nitric oxide. After sensitization with LPS, the release of IL-1 β and TNF- α were measured, and subsequently separately evaluated by ELISA. To identify substances with genotoxic activity the Comet test was employed, using the technique of electrophoresis on microgel. The results demonstrated that at the highest dose tested (3.0 $\mu\text{g/ml}$), the three forms of extraction were able to reduce ear edema by 44-46% and that the extract of *Malva sylvestris* in 100% ethanol concentration reached a higher inhibition (50.69%). In the *in vitro* tests, the treatment with hydroalcoholic extract was able to prevent the formation of nitric oxide by $80 \pm 14\%$ at the highest concentration used, in comparison to the control group, and the concentration of 1.0 $\mu\text{g/ml}$ was able to inhibit $86 \pm 2\%$ levels of IL-1 β . The levels of TNF- α were reduced by $84 \pm 4\%$. The hydroalcoholic extract obtained by maceration at 100% concentration suggests an anti-inflammatory potential when used topically in a skin inflammation model. In assessing cell culture it suggests the interference of the extract on the IL-1 β and TNF- α cytokines. This creates the need for further methods to investigate the cellular and molecular mechanisms on which the plant has an anti-inflammatory effect.

Keywords: *Malva sylvestris*. Periodontal disease. Inflammation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Fotomicrografias de folhas secas de *M. sylvestris* 39
comparativas com dados das monografias farmacopéias.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Média do Escore no ensaio de cometa em cultura de células 3T3, os experimentos foram realizados em triplicata (n = 3).....	48
----------	--	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Efeito dos diferentes métodos extratores e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA.....	41
Gráfico 2	Efeito dos diferentes métodos extratores da <i>M. sylvestris</i> e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA.....	41
Gráfico 3	Efeito dos diferentes extratos e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA.....	42
Gráfico 4	Efeito dos diferentes extratos da <i>M. sylvestris</i> e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA.....	43
Gráfico 5	LC-ESI-MS a análise do extrato hidroalcoólico (EHM) de <i>M. sylvestris</i> , de modo positivo: (A) cromatogramas do EHM não perfurantes, (B) em espectro de massa.....	45
Gráfico 6	Viabilidade celular (média e desvio-padrão) avaliada pelo método MTT.....	46
Gráfico 7	Grupos experimentais e as médias das classes de danos no DNA celular.....	49
Gráfico 8	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>M. sylvestris</i> e adicionado a fibroblastos 3T3 na produção Oxido Nítrico, estimulados por LPS.....	50
Gráfico 9	Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>M. sylvestris</i> e dexametasona (Dexa) adicionado a fibroblastos 3T3 na produção de IL-1 β (A) e TNF – α (B) estimulados por LPS.....	51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	O BIOFILME DENTAL.....	17
2.2	RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO BIOFILME DENTAL.....	18
2.2.1	Citocinas.....	19
2.2.2	Óxido Nítrico.....	20
2.2.3	Fibroblastos.....	21
2.2.4	Osteoclastos.....	21
2.2.5	Degradação da matriz extracelular.....	22
2.3	PERIODONTITE.....	22
2.4	MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	24
2.5	FITOTERAPIA.....	24
2.5.1	<i>Malva sylvestris</i>	26
2.5.2	Atividade Biológica.....	27
2.5.3	Constituintes fitoquímicos.....	27
3	OBJETIVOS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1.	MATERIAL BOTÂNICO.....	30
4.2.	PREPARO DO EXTRATO.....	30
4.2.1	Análise LC-MS.....	31
4.3	ANIMAIS.....	31
4.4	AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA.....	32
4.5	EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE TPA.....	33
4.6.	FIBROBLASTOS.....	33
4.7	VERIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE.....	34
4.7.1	Ensaio do MTT.....	34
4.8	VERIFICAÇÃO DE GENOTOXICIDADE.....	34
4.8.1	Ensaio do Cometa.....	34
4.9	QUANTIFICAÇÃO DE NO.....	36
4.10	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS.....	37
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5	RESULTADOS.....	38
5.1	CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL BOTÂNICO.....	38
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO.....	40
5.2.1	Avaliação do método extrator.....	40
5.2.2	Avaliação da concentração etanólica para extração.....	42
5.3	PERFIL FITOQUÍMICO DO EXTRATO.....	44
5.4	VERIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE.....	46

5.4.1	Ensaio do MTT.....	46
5.5	VERIFICAÇÃO DA GENOTOXICIDADE.....	47
5.5.1	Ensaio do Cometa.....	47
5.6	QUANTIFICAÇÃO DE NO.....	50
5.7	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS.....	51
6	DISCUSSÃO.....	52
7	CONCLUSÕES.....	58
	REFERENCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Os levantamentos epidemiológicos conduzidos a nível nacional em 1986, 1996 e 2004, comprovam a sensível melhora nas condições de saúde bucal nas crianças, por outro lado, os adultos e idosos confrontam um resultado de práticas odontológicas restritivas. Em 2003, o índice CPOD (número de dentes: cariados, perdidos, obturados) era 20,13 o que representa 65,7% de perda dentária na população (Brasil¹ 2003). Uma das principais doenças responsáveis pelo índice apresentado é a doença periodontal que tem como fator etiológico o biofilme dental (Azarpazhooh et al.² 2010).

A periodontite é uma doença inflamatória crônica causada por um grupo de bactérias, principalmente gram-negativas anaeróbias, que colonizam a área subgengival e podem levar à destruição dos tecidos que suportam os dentes, e em casos mais graves a perda do elemento dental (Heller et al.³ 1997, Bodet et al.⁴ 2008, Park et al.⁵ 2009). Essas bactérias, na grande maioria *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Bacteroides forsythus*; inseridas num biofilme, ficam protegidas, de certa forma, dos mecanismos de defesa do hospedeiro. Embora sejam responsáveis pelo início do processo, esses microorganismos são insuficientes para causar a doença, sendo essencial a presença de um hospedeiro susceptível (Heller et al.³ 1997, Page, Kornman⁶ 1997).

O tratamento de tal doença está diretamente ligado ao fator de virulência dos microorganismos que se estabelecem nos processos de saúde e doença. Desta maneira, as terapias devem ser direcionadas para o controle desses microorganismos. A raspagem e o alisamento radicular (RAR) é uma terapia inespecífica que tem capacidade de alterar microbiologicamente o ambiente subgengival e proporcionar resultados clínicos positivos. Todavia, tais resultados não persistem em longo prazo que se deve à recolonização dos sítios tratados pelas bactérias remanescentes da região subgengival, ou por agentes bacterianos provenientes da região supragengival (Faveri et al.⁷ 2006, Haffajee et al.⁸ 1997, Cugini et al.⁹ 2000, Cobb¹⁰ 2002).

As tentativas de intervir e impedir uma reação inflamatória exuberante nos tecidos tem tradicionalmente envolvido o uso de agentes farmacológicos, como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que antagonizam

vias pró-inflamatórias e/ou sinalizadoras (Van Dyke¹¹ 2008). Em contrapartida à agentes farmacológicos, produtos naturais estão sendo amplamente utilizados pela população em geral e incentivados pelo sistema público de saúde devido sua eficácia e facilidade de aquisição pela população em geral (Fernandes Junior et al.¹² 2006).

O uso de plantas e/ou os seus produtos com intuito de tratar de diversas doenças é conhecida como fitoterapia, que é considerada uma parte da medicina tradicional ou popular (El Ghaoui et al.¹³ 2008). Durante séculos, as plantas foram única fonte para solução de enfermidades para diferentes grupos étnicos, sendo usada hoje em dia como parte da medicina tradicional para tratar, aliviar ou prevenir muitas doenças (Kaileh et al.¹⁴ 2007).

Entre as plantas usadas na medicina popular, *Malva sylvestris* (Malvaceae) se destaca pela variedade de usos sendo relatados desde 3000 aC. Os estudos arqueológicos mostraram a existência de cálculo dentário em fósseis humanos da região da Síria, onde as sementes de *M. sylvestris* foram encontradas. Concluiu-se que o consumo desta planta é de longa data tanto por ser comestível e por suas possíveis propriedades medicinais (Henry, Piperno¹⁵ 2008).

Atualmente, a *M. sylvestris* ainda demonstra a sua importância como alimento e para fins terapêuticos. Vários estudos têm demonstrado importantes propriedades farmacológicas atribuídas a *M. sylvestris*, principalmente antiulcerogênica, antioxidante, antitumoral e no processo de reparo tecidual (DellaGreca¹⁶ 2009, Conforti et al.¹⁷ 2008; Chiclana et al.¹⁸ 2009; Daniela et al.¹⁹ 2007, Tomoda et al.²⁰ 1989, Barros, Carvalho, Ferreira²¹ 2010). Além disso, a atividade anti-inflamatória é amplamente conhecida e classicamente indicada para o tratamento bucal (Quave et al.²² 2008, Sleiman, Daher²³ 2009). Entre os componentes fitoquímicos relacionados se destacam aos efeitos farmacológicos levantam-se alguns flavonóides e mucilagens apresentados nas folhas e flores (Billeter, Meier, Sticher²⁴ 1991, Pourrat, Texier, Barthomeuf²⁵ 1990, Classen, Blaschek²⁶ 2002).

A realização de estudos com o objetivo de analisar as propriedades biológicas da *M. sylvestris*, podem contribuir para torná-la um agente potencial para tratamento/prevenção de doenças de origem odontológica, especialmente as de origem inflamatória como gengivites e doenças periodontais. Por isso, o objetivo do

presente trabalho: avaliar a atividade a anti-inflamatória do extrato hidroalcólico de *Malva sylvestris*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O BIOFILME DENTAL

Os dentes fornecem um ambiente favorável para a colonização de microorganismos, isso porque, podem se conectar as superfícies sólidas e agregar em uma matriz polimérica hidratada sua própria síntese para formar uma camada viscosa e escorregadia chamada biofilme (Saito et al.²⁷ 2010, Haffaje, Socranski²⁸ 2005).

O processo de desenvolvimento da placa ocorre em três etapas. Após a formação de uma película, microorganismos pioneiros se aderem a ela, proliferam e formam colônias. A fase final desse processo envolve a agregação de organismos filamentosos e espiroquetas em um biofilme coeso. Muitos produtos da placa bacteriana podem chegar ao tecido subepitelial causando reações inflamatórias através de mecanismos como aumento da vascularização e diapedese de leucócitos. A formação da placa poderá correr tanto supra como sugengivalmente e sofrer uma mineralização, o cálculo (Bemmimoulin²⁹ 2003).

A placa cervical associada ao dente apresenta dominância de bastonetes e cocos gram-positivos, incluindo *S. mitis*, *S. sanguis*, *A. viscosus*, *A. naeslundii* e espécies *Eubacterium*. Nas porções mais profundas da bolsa periodontal o número de microorganismos filamentosos torna-se menor e a microbiota é dominada por organismos menores, sem uma orientação particular. Estudos indicam uma predominância em regiões mais profundas de espécies como: *Streptococcus intermedius*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermédia*, *Tannarella forsythia* e *Fusobacterium nuleatum*. Células teciduais do hospedeiro também podem ser encontradas nesta região. Algumas vezes, são encontradas bactérias dentro dos tecidos do hospedeiro como nos tecidos moles e nos túbulos dentinários (Carranza et al.³⁰ 2007, Haffaje, Socranski²⁸ 2005).

Um equilíbrio dinâmico existe entre a placa bacteriana dental e o sistema de defesa inato do hospedeiro. A placa dental bacteriana tem estratégias de sobrevivência adaptativa que favorecem seu crescimento no meio, enquanto que o hospedeiro normalmente limita o crescimento por uma combinação das respostas

imune inata e adaptativa. Esta interação não é um processo casual, mas representa uma interação altamente evoluída entre a bactéria e o hospedeiro (Darveau³¹ 2010).

2.2 A RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO BIOFILME DENTAL

Há um equilíbrio dinâmico entre a placa dental bacteriana e o sistema de defesa do hospedeiro. As bactérias da placa dental possuem estratégias de sobrevivência que favorecem o crescimento na superfície dentária, enquanto o organismo procurar limitar o crescimento por meio de uma combinação de respostas imunológicas (inata e adaptativa). As bactérias liberam antígenos como lipopolissacarídeos (LPS) que o organismo reconhece com estranho e desencadeia uma série de sinalizações intracelulares como parte do sistema de defesa. Porém, em certas condições em que há uma aquisição de novas espécies e um desequilíbrio na resposta do hospedeiro, as bactérias podem causar inflamação destrutiva aos tecidos (Daveau³¹ 2010). Em particular, o LPS de *Actinomyces comitans* Agregatibacter é o principal agente etiológico da doença periodontal agressiva localizada acredita-se estar envolvido no processo de degradação do tecido conjuntivo (Bodet, Chandad, Grenier³² 2007).

Bactérias do tipo gram-negativas são constituídas por endotoxinas, os LPS, que lhes fornece propriedade patogênica e fator de virulência para o hospedeiro. Os LPS são macromoléculas que devido a falta de domínio celular associam-se com a proteína CD14, o complexo LPS-CD14 associa-se e ativa o receptor da proteína o Toll-like (TLR-4), que estimula um grande número de sinais intracelulares, entre os quais, a ativação da fosfolipase A (Fort et al.³³ 1985, Lima et al.³⁴ 2010), ativação da fosfolipase C e aumento da concentração intracelular de cálcio (Waga et al.³⁵ 1993), aumento na atividade de tirosina quinase (Han et al.³⁶ 1993), p42/p44 (Weinstein et al.³⁷ 1992), e p38 (Lee et al.³⁸ 1994). A ativação de algumas ou de várias destas proteínas leva ao aumento da produção e liberação, pelas células, de mediadores inflamatórios tais como: prostaglandinas (PGs), óxido nítrico (NO) e interleucinas (ILs) (Lee et al.³⁸ 1994, Bodet, Chandad, Grenier³² 2007, Gutiérrez-Venegas et al.³⁹ 2006).

Os produtos bacterianos presentes no sulco gengival provocam uma resposta inflamatória de tal forma, a causar alterações vasculares e celulares em

resposta aos microorganismos. A liberação de histamina, cininas, componentes do complemento, prostaglandinas, fator de ativação de plaquetas (PAF) e IFN (interferon)- γ provocam alterações na microcirculação e, principalmente, aumento da permeabilidade vascular resultando no aumento do fluxo do fluido gengival. Células inflamatórias, tais como: leucócitos, macrófagos, mastócitos e linfócitos estão no tecido do periodontal (Henderson, Poole, Wilson ⁴⁰ 1996, Jorge et al. ⁴¹ 1998).

2.2.1 Citocinas

As citocinas são proteínas solúveis que, coletivamente servem como mediadores da função das células e são produzidas por vários tipos celulares tais como: estruturais e células inflamatórias, além de apresentar papel no mecanismo da homeostase do tecido e também na patogênese de muitas doenças infecciosas (Okada, Murakami ⁴² 1998).

O primeiro evento a ocorrer no início da doença periodontal e da gengivite é uma alteração vascular de pequenos vasos no epitélio juncional. As aminas vasoativas e as prostaglandinas causam uma dilatação nos vasos e as células endoteliais são induzidas pelos componentes bacterianos e citocinas para expressar a molécula de adesão intercelular em suas superfícies (Page, Schoroeder ⁴³ 1976). Fatores complementares de ativação, leucotrienos, fator de necrose tumoral induzem os polimorfonucleares e os monócitos a expressar adesão molecular por meio do qual as células aderem ao endotélio e migram para o tecido conjuntivo. A permeabilidade vascular torna-se muito maior, resultando na passagem de grande parte dos componentes do sangue para o tecido conjuntivo (Marlin, Springer ⁴⁴ 1987). Apesar dos componentes e produtos da placa bacteriana desencadear esses eventos, mediadores inflamatórios incluindo citocinas e produtos do ácido araquidônico, do sistema complemento, e proteases plasmáticas perpetuam e ampliam o processo. A soma de todos os eventos se manifesta clinicamente como inflamação aguda e crônica (Lindhe, Helldén ⁴⁵ 1972, Page ⁴⁶ 1991).

O equilíbrio entre a formação óssea e a reabsorção óssea em doenças inflamatórias é muitas vezes interrompido. No processo de patogênese da doença periodontal tem sido sugerido que a citocina IL-1 desempenha papel fundamental se tornando um componente crítico para a homeostase dos tecidos

periodontais. Algumas funções podem ser destacadas para IL-1: aumento da reabsorção óssea, estimulação da produção de metaloproteinases, estimulação de ativadores plasmáticos estimulação na síntese de proteínas (Okada, Murami⁴² 1998).

Estudo *in vitro* evidenciou que a IL-1 β é significativamente mais potente do que qualquer IL-1 e TNF- α exercendo papel mediador sobre o osso, ela possui a mesma função biológica que a IL-1- α e as duas formas se ligam a interleucina por meio de um receptor encontrado também no TNF- α que estimula a reabsorção e inibem a formação óssea (Alexander, Darmoulis⁴⁷ 1994).

A terapia anticitocinas na doença periodontal envolve principalmente TNF- α , IL-1 β e IL-6, por serem essenciais no início da reação inflamatória imune onde são produzidas por períodos prolongados na doença inflamatória (Waykole⁴⁵ 2009). As mesmas citocinas também são cruciais na indução da resposta de fase aguda, que é parte integrante da nossa defesa inata contra microorganismos infectantes. Citocinas não tem inerentes, por exemplo, atividade enzimática e produzem seus efeitos biológicos apenas quando eles se ligam às suas especificidades, de alta afinidade à receptores na superfície das células alvo, induzindo intra-específicas vias de sinalização celular, e, eventualmente, resultando na ligação de um conjunto particular de genes (Henderson,Poole, Wilson⁴⁸ 1996).

2.2.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico é um radical livre que apresenta complexo mecanismo tanto em condição de saúde como de doença. Está estabelecido que o NO é essencial em um amplo espectro de eventos intra e extracelulares e presente na grande variedade de tecidos, além da implicação em numerosas doenças como inflamatórias e autoimunes (Kendall, Marshall, Bartold⁴⁹ 2001).

NO tem papel importante no mecanismo da vasodilatação, estimulação de citocinas, regulação da função de tecidos mineralizados, neurotransmissão, e a agregação plaquetária, no entanto, em condições patológicas o óxido nítrico tem efeitos prejudiciais. É uma molécula sintetizada pela NO sintase (NOS) e induzível pela iNOS está intimamente relacionada com as características

fisiopatológicas das doenças inflamatórias, como as doenças periodontais (Ugar-Çankal, Osmeric⁵⁰ 2006).

De acordo com a literatura, a formação de NO pode ser interferida pelos estímulos inflamatórios que podem levar a uma maior síntese do mesmo e ainda interferir na progressão da doença periodontal (Kendall, Marshall, Bartold⁴⁹ 2001, Matejka et al.⁵¹ 1998).

2.2.3 Fibroblastos

Os fibroblastos gengivais é o tipo de célula predominante no tecido conjuntivo periodontal. Eles produzem componentes da matriz extracelular e enzimas para a degradação da matriz que levou à doença periodontal inflamatória. Estudos *in vitro* demonstraram que os fibroblastos obtidos de tecido periodontal inflamado e saudável diferem de tamanho e forma das células, a taxa proliferativa, a produção de colágeno e a expressão dos fatores de crescimento (Irwin, Schor, Ferguson⁵² 1991). Em locais como o biofilme dental e nas bolsas periodontais há uma colonização de periodontopatógenos, entre eles, a *Porphyromonas gingivalis* que é o principal agente etiológico da periodontite crônica. Esses microorganismos possuem fatores de virulência que causam a destruição do tecido periodontal, a exemplo, a secreção e ativação de metaloproteinases como: MMP-2 e MMP-9 (Yanti, Hwang⁵³ 2010).

2.2.4 Osteoclastos

Uma vez que os processos imune e inflamatório são iniciados, diferentes moléculas inflamatórias, incluindo proteases, metaloproteinases, citocinas, prostaglandinas e enzimas do hospedeiro são liberadas dos leucócitos, dos fibroblastos ou das células estruturais dos tecidos. As proteases tendem a romper a estrutura do colágeno dos tecidos criando, assim, incursões para uma posterior infiltração leucocitária. Embora a produção de collagenase pelos neutrófilos infiltrantes seja parte da resposta natural do hospedeiro à infecção, existe um equilíbrio entre o nível de MMPs histodestrutivas e os seus inibidores endógenos na

doença periodontal e em outras doenças inflamatórias (Kornman, Page, Tonetti⁵⁴ 1997).

À medida que a doença periodontal progride, as fibras colágenas e a fixação conjuntiva aos dentes são destruídas, além disso, osteoclastos ativados iniciam a destruição óssea. Fatores estimulatórios como a alta secreção de citocinas r do tipo IL-1, fator de necrose tumoral α , e o fator estimulador das colônias de macrófagos (M-CSF) que é produzido pelas células do estroma da medula óssea, monócitos e células T são reguladores fundamentais nesse processo. A osteoprotegerina (OPG) age como um receptor que impede que o RANKL se ligue ao seu receptor RANK nas células precursoras e há controle insuficiente da osteoclastogênese (Carranza et al.³⁰ 2007, Kornman, Page, Tonetti⁵⁴ 1997, Adrian, Grenier, Rouabhia⁵⁵ 2004).

2.2.5 Degradação da matriz extracelular

A degradação da matriz extracelular durante a inflamação periodontal é um processo de várias fases que envolvem várias enzimas proteolíticas. Diferentes tipos celulares do tecido periodontal produzem matriz metaloproteinases (colagenases, estromelisinases, gelatinases, metaloproteinases tipo-membrana), ativador de plasminogênio, catepsinas e elastases (Birkedal-Hansen⁵⁶ 1993; Suomalainen et al.⁵⁷ 1989). Em resposta à bactérias e citocinas inflamatórias, fibroblastos, células epiteliais juncionais, osteoblastos/osteoclastos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares liberam proteinases que estão envolvidas na defesa contra microorganismos, mas, ao mesmo tempo, contribuem para a destruição do tecido periodontal pela degradação da matriz extracelular e dos componentes da membrana basal (Birkedal-Hansen⁵⁶ 1993, Heath et al.⁵⁸ 1982; Salonen et al.⁵⁹ 1991, Sorsa et al.⁶⁰ 1988, Pollanen et al.⁶¹ 2003).

2.3 PERIODONTITE

A doença periodontal é caracterizada por um processo inflamatório que conduz a uma perda de inserção induzida por microrganismos presentes na superfície dental e sulco gengival/bolsa periodontal associado a condições imuno-

inflamatórias do indivíduo e quando não tratada pode levar a perda do dente (DeSanctis, Murphy⁶² 2000, Park et al.⁵ 2009).

O tratamento de tal doença está voltado ao fator de virulência, aos microrganismos que se estabelecem nos processos de saúde e doença, desta maneira, as terapias devem ser direcionadas para o controle desses microrganismos. Embora seja indiscutível o papel do biofilme bacteriano na etiologia das doenças periodontais, a severidade e a progressão destas doenças são, também, determinadas por fatores relacionados à resposta do hospedeiro (Seymour, Heasman⁶³ 1988).

Em todo o curso da doença periodontal existe um aumento de 80% de microrganismos gram-negativos que colonizam o sulco gengival formando placa subgengival; entre as bactérias presentes são encontradas *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* e *Bacteroides forsythus* (Gutiérrez-Venegas et al.³⁹ 2006). Estas bactérias periodontopatogênicas produzem fatores de virulência (LPS e peptidoglicano), que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo hospedeiro (Ara et al.⁶⁴ 2009).

A alta secreção contínua de citocinas como interleucina (IL-1 β , IL-6, IL-8) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), bem como de prostaglandina E2 (PGE2) pelas células hospedeiras, seguidas de estimulação por periodontopatógenos e seus produtos, é um determinante crítico da destruição do tecido periodontal (Okada, Murakami et al.⁴² 1998, Birkedal-Hansen⁶⁵ 1993, Bodet Chandad, Grenier et al.⁶⁶ 2007).

Alguns fatores como diabetes mellitus, tabagismo e estresse, bem como características geneticamente transmitidas como o polimorfismo do gene de IL-1 são considerados de risco por acentuar resposta inflamatória do hospedeiro frente à microbiota local e, eventualmente, a uma maior suscetibilidade a instalação do processo de doença (Kornman, Di Giovane⁶⁷ 1998, Salvi, Beck, Offenbacher et al.⁶⁸ 1998, Kinane, Chestnutt⁶⁹ 2000, Albandar⁷⁰ 2002, Salvi, Lang⁷¹ 2005).

2.4 MODULAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A intervenção na doença periodontal pode incluir a partir da década de 90 a terapia modulatória do hospedeiro (TMH) como uma das opções adjuntivas de tratamento. O termo adjuntivo significa “em adição às terapias convencionais” ou em adição a outras terapias estabelecidas. Inicialmente as terapias associadas ao tratamento convencional envolvem unicamente antimicrobianos, como o uso de anti-sépticos e antibióticos (Golub Golub, Suomalainen, Sorsa⁷² 1992).

Alguns agentes moduladores têm sido estudados como coadjuvantes da terapia periodontal não cirúrgica. Dentre eles, anti-inflamatórios sistêmico e tópicos, sub-doses de doxicilina e o uso de bifosfonatos. Os anti-inflamatórios são bloqueadores da inflamação e da dor. A doxicilina, um antimicrobiano em sub-doses atua como inibidora de metaloproteinases sendo a única terapia aprovada e indicada para complemento na terapia convencional de raspagem e alisamento radicular em casos de periodontite crônica (Bartold, Cantley, Haynes⁷³ 2010).

Anti-inflamatórios não esteroidais não são utilizados comumente no tratamento e prevenção da periodontite, particularmente em razão dos efeitos colaterais dessas drogas (desconforto, úlceras gastrintestinais e insuficiência renal), quando administrados sistemicamente e por longos períodos, os quais poderiam ser mais severos do que a própria doença a ser tratada (Seymour, Heasman⁶³ 1988, Gurgel et al.⁷⁴ 2004). Por séculos, óleos essenciais e outros produtos derivados de plantas têm sido utilizados no controle da inflamação oral e subsequente dor associada com doenças periodontais (Shapiro, Meier, Guggenheim⁷⁵ 1994, Tipton, Hamman, Dabbous et al.⁷⁶ 2006).

2.5 FITOTERAPIA

O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e principalmente toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Isto acontece com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população. A identificação correta destas espécies, sua forma de uso, posologia e

controle de qualidade também constituem questões a serem resolvidas (Billeter, Meier, Sticher²⁴ 1991).

As plantas medicinais vêm sendo propagadas de geração em geração e descritas nas diversas farmacopéias. A partir do desenvolvimento da química orgânica, tornou-se possível obter substâncias puras por meio do isolamento de princípios ativos de plantas, entre elas, a digoxina e a morfina, resultando em desinteresse pela pesquisa de substâncias de origem vegetal (Turolla, Nascimento⁷⁷ 2006).

É considerado fitoterápico, de acordo com a legislação sanitária brasileira, o medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. É caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (Brasil⁷⁸ 2004).

A partir das plantas é possível obter uma grande variedade de polissacarídeos que irão atuar por meio da atividade estimulante do sistema imune do indivíduo. Pectinas ácidas e arabinogalactanos foram relatadas para aumentar a fagocitose, ativar o sistema complemento, induzir a produção de TNF- α , melhorar a proliferação de linfócitos e induzir a maturação de células dendríticas. Outros autores relataram outras propriedades presentes nas plantas podendo ser citadas as atividades antitumoral, antibacteriana e antiviral (Cao, Sun⁷⁹ 1998).

Limitados estudos clínicos e *in vitro* sugerem que os produtos vegetais podem reduzir a inflamação periodontal e ser efetivos contra bactérias patogênicas que causam periodontite (Cao, Sun⁷⁹ 1998, Tipton, Hamman, Dabbous et al.⁷⁶ 2006).

Diversas plantas são citadas na literatura com possíveis propriedades farmacológicas de importância clínica, dentre elas, a planta *Malva sylvestris* L que é uma erva mucilagínosa e levemente adstringente é citada na literatura etnofarmacológica como medicação capaz de suavizar a irritação dos tecidos e reduzir inflamações e, além disso, é empregada na forma de bochechos e gargarejos contra inflamações e afecções da boca e da garganta (Lorenzi, Matos⁸⁰ 2002, Ogura et al.⁸¹ 1994, Watanabe et al.⁸² 1996, Gutiérrez-Venegas et al.⁸³ 2006).

2.5.1 *Malva sylvestris*

Malva sylvestris L. é uma planta herbácea, bianual ou perene, ereta ou decumbente, com ramos de casca fibrosa. Tem 40-70 cm de altura. Suas folhas são simples com nervação palmada, de margens lobadas e irregularmente serradas, revestidas de pelos ásperos, de 7-15 cm de comprimento. As flores são vistosas, de cor púrpura ou vários tons de rósea, dispostas solitariamente nas axilas foliares. Os frutos são aquênios discóides (Lorenzi, Matos⁸⁰ 2002).

Conhecida como Malva, é nativa na Europa, Norte da África e Ásia, usualmente cultivada no sul do Brasil e o uso tradicional tem sido documentado há muito tempo atrás, além de poucas relevâncias clínicas terem sido relatadas. Os gregos e Romanos usavam a malva com finalidade emoliente e laxativa e muitas pesquisas etnobotânicas foram conduzidas na Europa visando o potencial dos recursos locais (Novais et al.⁸⁵ 2004, Barros, Carvalho, Ferreira²¹ 2010, Ferreira et al.⁸⁶ 2006) .

Entre as plantas usadas na medicina tradicional a *M. sylvestris* demonstra ter uma variedade de uso reportado desde 3000 A.C. O pressuposto de que o uso da planta é de longa data se confirma por estudos arqueológicos realizados na região da Síria onde foram encontrados em cálculo humano a presença de *M. sylvestris* (Henry, Piperno¹⁵ 2008).

Diversos estudos têm atribuídos significantes propriedades farmacológicas a *M. sylvestris*, como antiulcerogênica, antioxidante, anticâncer e no reparo tecidual. As partes mais significantes para atividade biológica são as flores e as folhas. Doenças respiratórias também são tratadas pelas partes aéreas e raízes da *M. sylvestris*. Neste caso a decocção e a infusão são muito usadas contra a tosse, laringite e faringite além de ser efetiva em casos de bronquite (Passalacqua, Guarrera, De Fine⁸⁷ 2006).

No entanto, a atividade anti-inflamatória é extensamente e relacionada para o tratamento de doenças bucais (Guarrera, Forti, Marignoli⁸⁸ 2005, Ishtiaq et al.⁸⁹ 2007). As folhas, flores e as partes aéreas têm sido extensamente conhecidas e usadas de forma interna e tópica como anti-inflamatório contra afecções como gengivites, abscessos e dores de origem dentária (Scherrer, Motti, Weckerle⁹⁰ 2005, Conforti et al.¹⁷ 2008, El Beyrouthi⁹¹ et al. 2008, Pollio et al.⁹² 2008, Idolo, Motti, Mazzoleni⁹³ 2010).

M. sylvestris tem sido descrita como efetiva no tratamento inflamatório e situações de dor. Na forma de formulações tópicas foram demonstradas significantes propriedades anti-inflamatórias em edema de camundongos e ratos. Além do mais uma inibição de (60%) das condições inflamatórias foram alcançadas em concentrações de 100 mg/kg corpóreo e relatado como considerável efeito nociceptivo (>60%)(Sleimam, Daher⁹⁴ 2009).

2.5.2 Atividade Biológica

A atividade biológica da Malva pode ser atribuída aos antioxidantes, tais como: polifenóis, vitamina C, vitamina E, vitamina D e outros fitoquímicos importantes. Os polifenóis são metabólitos secundários e amplamente distribuídos em plantas e alimentos de origem vegetal. Os benefícios proporcionados à saúde devido às ações: vasodilatadora, anti-inflamatórias, anticancerogênica, antiviral e antibacteriana originados do efeito antioxidativo destes fitoquímicos, que são baseados em sua capacidade de limpar os diferentes radicais livres levando à proteção de moléculas biológicas contra a oxidação (Rackova et al.⁹⁶ 2009).

Entre todos os antioxidantes presentes nas células vegetais, a vitamina C (ácido ascórbico) que desempenha um papel relevante no controle da homeostase reativa do oxigênio (ROS) por meio de reações enzimática e não enzimática (Locato et al.⁹⁷ 2009).

2.5.3 Constituintes fitoquímicos

Muitos estudos têm sido conduzidos de diferentes partes da planta envolvendo o isolamento, identificação e quantificação dos compostos químicos. Neste contexto, derivados de aminoácidos/proteínas, açúcares, mucilagens, fenóis, enzimas, cumarinas, ácidos graxos e flavonóides foram isolados a partir do: caule, folhas, flores, frutas e sementes. Também foram isolados vitaminas, compostos radioecológicos, pigmento e elementos químicos foram isolados e descritos na literatura (Billeter, Meier, Sticher²⁴ 1991, Pourrat, Texier, Barthomeuf²⁵ 1990).

A análise fitoquímica da planta registrou a presença de 10-20% de mucilagem, acompanhada de menores quantidades de caroteno e vitaminas C. Também foram encontrados antocianósidos (7%) (malvósido e malvina), taninos, flavonóides sulfatados, ácidos fenólicos e sais minerais. As mucilagens descritas como ação protetora das mucosas além da ação emoliente, mucolítica e laxante (Lorenzi, Matos⁸⁰ 2002).

Os antocianósidos e os flavonóides são responsáveis pela ação anti-inflamatória. Informações sobre a ocorrência de flavonóides nas espécies da família *M. sylvestris* são restritas. No entanto, apesar de poucas serem as informações, a planta é constituída de grandes concentrações de flavonóide em várias partes da mesma. Em um estudo envolvendo o potencial nutracêutico, o total de flavonóides encontrados foram de 210.8, 46.6, 25.4 e 143.4 mg/g de extrato em folhas, flores, frutos imaturos e hastes de flores, respectivamente (Barros, Carvalho, Ferreira²¹ 2010).

A variedade de antocianósidos presente nas flores da malva é muito grande, por isso para quantificar esses metabólitos foram utilizadas a espectrofotometria e a cromatografia (HPLC). Em um estudo conduzido por Pourrat, Texier, Barthomeuf²⁵ (1990), o total de antocianósidos contidos variou de 6.08 a 7.3% da massa inicial de matéria seca.

3 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Desenvolver o biomonitoramento do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* nas concentrações de 80, 90 e 100% e posterior escolha do extrato;
- Analisar o perfil fitoquímico da *Malva sylvestris*;
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* em fibroblastos (Linhagem 3T3) sobre a liberação de IL-1 β , TNF- α , NO induzida por LPS;
- Verificar a toxicidade do extrato da *M. sylvestris* sobre fibroblastos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal fornecido por Quimer Ervas Medicinais e Especiarias (São Paulo - Brasil), estabilizada e rasurada. Dados gerais do material podem ser obtidos por meio do certificado de análises do fornecedor: insumo- malva padrão importada; parte utilizada - folhas e caules. O extrato hidroalcoólico preparado pelo professor Moacir Pizzolatti do departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, a partir das folhas secas da *M. sylvestris*.

4.2. PREPARO DO EXTRATO

As folhas de *M. sylvestris* (3 kg) foram submetidas à extração por maceração exaustiva com EtOH (EtOH 100%), a temperatura ambiente, durante uma semana. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor sob pressão reduzida, a 50 °C, até 1/3 de seu volume inicial. O extrato hidroalcoólico foi mantido em repouso por alguns dias a 4 °C. Em seguida foi realizada uma filtração para separar o resíduo sólido do restante do extrato. O protocolo de extração foi adaptado de Pourrat, Texier, Barthomeuf²⁵ (1990) et al.²⁵, Billeter, Meier, Sticher²⁴ (1991) e Cutillo et al.⁹⁸ 2006.

O extrato sólido e o restante (resíduo) foram obtidos pela filtração do extrato, mostrando um rendimento de 43(g) (20.92%) e 157.60g (76.69%), respectivamente. Para análise de HPLC-MS, uma solução de estoque do extrato cru preparada em metanol na concentração de 65,55 mg/ml. A solução de trabalho contendo malvidina 3-glucosídeo, quercetina e escopoletina foram obtidas diluindo uma solução de estoque com água-acetonitrada (50:50, v/v), resultando em uma concentração final de 10µg/mL para malvidina 3-glucosídeo e 5µg/ml para quercetina e escopoletina. Todas as soluções foram acondicionadas em temperatura à -40°C. Estas soluções foram filtradas a 0.45 µm em membrana de PVDF (Millipore).

4.2.1 Análise LC-MS

A análise do extrato hidroalcolico foi conduzida com Agilent HPLC System modelo 1100 (Wilmington, DE, USA) consistindo de um quaternário G1311A, G1379A degaseificador, uma coluna G1316A aquecida e conectada em um modelo 2777, obtido a partir da Waters Corporation. Este sistema foi obtido pelo Espectrofotômetro Triplo Quádruplo LC-MS/MS, equipado com eletrospray ionizado (ESI). O sistema HPLC foi operado usando um gradiente de condições em XBridge c18 (10 mm x 4,6 mm, I.D., 5 mM de partículas tamanho) coluna de guarda. A fase móvel consistiu de água com fórmico 0,05% ácido ou 5 formiato de amônio mM (canal A) e acetonitrila com 0,05% fórmico. Ácido ou 5 formiato de amônio mM (canal B) em um gradiente de diluição começou a partir 95% para 70% B por 30 min, 70% a 60% B por 10 min, 60% a 95% para B 10 min. A vazão foi mantida em 0,450 ml / min e injeção de 20 mL. Aquisição de dados foi realizada com Workstation MS pela análise do 1.4.2(ABI / Sciex). A sonda ionizada turbo (ESI) no modo positivo e negativo foram utilizadas para estes experimentos. Os parâmetros de fonte de íons foram: ESI modo positivo – potencial (DP): 25 V; Cortina de gás (CUR): 10; spray ionizado de tensão (IS): 5500 V; nebulizador de gás (GS1): 45; de gás do aquecedor turbo (GS2): 45 e temperatura: 400°C. O nitrogênio usado como cortina, e nebulizador aquecedor a gás turbo foi produzido por um gerador de nitrogênio de alta pureza (PEAK Instrumentos científicos, Chicago, IL).

4.3 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos Swiss (25-35 g) provenientes e mantidos no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, em temperatura de 22 ± 2 °C, respeitando uma fase clara/escuro de 12 horas, com livre acesso a água e ração. Antes do início dos experimentos os animais foram mantidos no laboratório por um período de pelo menos 1 hora para adaptação, não sendo estes animais reutilizados em testes posteriores. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para

os cuidados com animais de laboratórios. O presente projeto foi submetido à avaliação do comitê de ética em experimentação animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob o número 399.

4.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE ORELHA

O modelo animal escolhido para estudar o processo inflamatório cutâneo foi a indução de edema na orelha de camundongos por ser este um modelo que consiste num método rápido e simples e requer pouca quantidade de substâncias além permite resultados reprodutíveis. No que diz respeito à sua aplicação farmacológica, este modelo induzido por diferentes agentes, onde permitem uma variedade de modelos de inflamação cutânea apropriados para a avaliação tanto tópica como sistêmica de agentes sintéticos, extratos de plantas, bem como substâncias isoladas de planta (Gabor⁹⁹ 2000; Winyard¹⁰⁰ 2003).

Este modelo foi empregado com o objetivo de verificar inicialmente a formação de edema que foi induzido por aplicação tópica de TPA, o que auxiliou na identificação de qual melhor extrato e também qual melhor forma extratora. O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura da orelha dos camundongos em μm . A espessura foi medida antes e após a indução do processo inflamatório utilizando um micrômetro digital (Great MT-04513). A medida foi realizada próxima à extremidade medial da orelha e registrando a sua espessura através da diferença entre a primeira medida (basal) e a medida final (após 6 horas) após a indução do processo inflamatório. Para minimizar variações de medida na técnica, os experimentos foram realizados por um único experimentador. Os diferentes extratos (concentrações etanólicas de 80, 90 e 100% e nas doses 0,1; 0,3; 1,0; 3,0 mg/orelha) o controle positivo Dexametasona (0,05 mg/orelha) e o agente flogístico TPA (0,025 mg) foram dissolvidos em 0,02 mL de acetona e aplicados na orelha direita de camundongos de forma tópica.

4.5 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE TPA

Um dos constituintes ativos do óleo de cróton é o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). A aplicação tópica de ésteres de forbol, como o TPA, induz inflamação na pele e respostas hiperproliferativas (quando aplicado de forma crônica) nos animais, assemelhando-se sob muitos aspectos aos sinais de algumas doenças de pele como a psoríase (Gabor⁹⁹ 2000). O edema foi induzido pela aplicação tópica de TPA (0,25 mg) na orelha direita de camundongos sobre um volume de 20 µl. As diferentes formas extratoras e os diferentes extratos etanólicos, da *M. sylvestris* e a dexametasona (utilizada como controle positivo) foram aplicados topicamente seguindo o mesmo procedimento logo após a aplicação do TPA. A variação da espessura da orelha foi avaliada 6 horas após a aplicação do agente flogístico (TPA) (Young¹⁰¹ et al. 1984).

4.6 FIBROBLASTOS

Fibroblastos provenientes do banco de células do Rio de Janeiro linhagem 3T3, foram cultivados em meio de cultura completo Dulbecco Mem (DMEM) contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, a 37°C e CO₂ a 5% até subconfluência. Após atingirem subconfluência, a cultura foi repicada ressuspendendo as células com o uso de tripsina e passadas da garrafa para placa. As células foram analisadas para testes experimentais após quatro passagens. O protocolo foi adaptado de Keila et al.¹⁰² (2004).

4.7 VERIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

4.7.1 Ensaio do MTT

O ensaio é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais celulares em converter o substrato amarelo e solúvel em água MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio] no produto azul-escuro Formazan, insolúvel em água (Doyle, Griffiths¹⁰³ 1998). Após incubação de 24 horas das células, em placa de 96 poços, com de extrato hidroalcoólico de *M. sylvestris* diluído em meio de cultivo com apenas 1% de soro fetal bovino, numa variação de concentração de 0,01 a 10µg/mL, este meio foi retirado e feito uma lavagem com PBS (Tampão Fosfato de Sódio). Após lavagem, foi adicionado meio com 1% de soro fetal bovino contendo o corante MTT (0,5 mg/mL). As células foram incubadas durante 3 horas (37°C), tempo necessário para a redução do corante. Em seguida o meio foi retirado cuidadosamente e adicionados 200µl de etanol P.A. em cada poço para solubilização do Formazan. A placa foi agitada durante 5 minutos e a absorbância correspondente foi medida no leitor de placas a 570 nm. A absorbância das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (Silva et al.¹⁰⁴ 2004).

4.8 VERIFICAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

4.8.1 Ensaio do Cometa

O ensaio mais utilizado para identificação de substâncias com atividade genotóxica através da detecção de DNA danificado é o Ensaio do Cometa ou Single-Cell Gel (SCG) (Tice et al.¹⁰⁵ 2000). O método foi primeiramente introduzido por Ostling e Johanson¹⁰⁶ (1984), por meio da técnica de eletroforese em microgel. Uma versão modificada foi publicada por Singh et al. em 1988, usando condições alcalinas com o intuito de combinar gel de eletroforese com microscopia

de fluorescência para visualizar migração de fragmentos de DNA de células individuais embebidas em agarose. Em 1990, a modificação do método original de Ostling, Johanson¹⁰⁶ (1984) foi introduzida e denominada Ensaio do Cometa devido à aparência do DNA de uma célula individual após o ensaio (Olive et al.¹⁰⁷ 1989). A cabeça do cometa contém DNA de alto peso molecular e a cauda do cometa contém os fragmentos migrados, mensurados em tempo real de imagens digitalizadas usando software desenvolvido para este propósito (Olive¹⁰⁷ 1989, Olive, Banath, Durand¹⁰⁸ 1990). As células foram cultivadas em placas de Petri com densidade de 1.0×10^6 células/placa. Após 24 horas de incubação, cada uma das placas receberam um tratamento diferente e foram novamente incubadas: 1) Controle negativo (somente células) 2) Controle Positivo (H_2O_2 100 μM) 3) Controle Positivo (H_2O_2 125 μM) 4) Teste do Extrato 0,3 $\mu g/ml$ 5) Teste do Extrato 1 $\mu g/ml$ 6) Teste do Extrato 3 $\mu g/ml$ (Coura¹⁰⁹ 2004); 6) Meio DMEM. As células foram lavadas com PBS e em seguida aplicada Tripsina para posterior transferência para tubo Falcon onde foram centrifugadas por 4 minutos a 1000rpm. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (*pellet*) ressuspenso em 0,125 ml de meio DMEM (Coura¹⁰⁹ 2004). O meio esteve gelado para minimizar agregação celular e inibir reparo de DNA (Olive, Banath¹⁰⁸ 1990). Em microtubo foram misturados 0,01 ml de suspensão celular com 0,120 ml de agarose de baixo ponto de fusão e, a mistura, depositada sobre lâmina coberta com agarose. As lâminas foram cobertas com lamínulas e deixadas em refrigerador por 10 minutos. Após este tempo, as lamínulas foram gentilmente retiradas, e as lâminas, colocadas em solução de lise *overnight*. As lâminas foram transferidas para cuba horizontal e cobertas com tampão de eletroforese, onde permaneceram por 30 minutos para desnaturação do DNA. Então, foi realizada a eletroforese com a cuba mergulhada em gelo a 25V/ 300mA por 25 minutos. Após o processo de eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e neutralizadas com tampão de neutralização (3 vezes de 5 minutos cada). As lâminas foram inclinadas até secagem, fixadas em etanol por 5 minutos e deixadas secar novamente; foram coradas no momento da análise adicionou-se 25 μL da solução de uso de brometo de etídeo. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina classificando-os em dano Grau 0, 1, 2, 3 ou 4. O Ensaio do Cometa-procedimento que foi realizado no escuro (Olive, Banath¹⁰⁸ 2006).

As células foram visualmente pontuadas de acordo com o comprimento da cauda em cinco classes: (1) Classe 0: sem danos, sem cauda; (2)

classe 1: com a cauda mais curta do que o diâmetro da cabeça (núcleo), (3) a classe 2: com a cauda $1-2 \times$ o diâmetro da cabeça; (4) classe 3: com a cauda mais de $2 \times$ o diâmetro da cabeça, e (5) classe 4: cometas sem cabeças. Orientações e recomendações internacionais para a pontuação ensaio cometa visual é considerado como um método de avaliação válido (Burlinson¹¹⁶ et al. 2007, Hartmann, Speit¹¹⁷ 1997; Tice et al.¹⁰⁵ 2000).

Índice de dano (DI) ou Score é uma pontuação arbitrária calculada para células em diferentes classes de danos, que são visualmente marcados por medição do comprimento DNA migração ea quantidade de DNA na cauda. DI varia de 0 (sem cauda: $100 \text{ células} \times 0$) a 400 (com a migração máxima: $100 \text{ células} \times 4$) (Tice et al.¹⁰⁵ 2000).

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE NO

Entre os vários métodos para a detecção da produção de óxido nítrico em sistemas celulares, aqueles baseados no uso de sondas fluorogênicas ganharam popularidade devido à simplicidade e à sensibilidade. FM 4-amino-5-metilamino-2', 7'-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM DA) é uma sonda que permeia a membrana e é desacetilada por esterases intracelulares a 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM). DAF-FM é essencialmente não fluorescente até que seja nitrosilado por produtos de oxidação do óxido nítrico para formar heterociclos fluorescentes, os quais não podem mais sair do citoplasma (Itoh et al.¹¹⁰ 2000, Kojima et al.¹¹¹ 1999, Balcerzyk et al.¹¹² 2005). Em microplaca preta de 96 poços, as células foram incubadas com solução de $10 \mu\text{M}$ de DAF-FM por 60 minutos a 37°C . Após esse tempo, as células foram lavadas para remover o excesso da sonda e foram incubadas com meio DMEM incolor incompleto por 15-30 minutos para permitir completa de-esterificação de diacetato intracelular. Então, as células foram incubadas, 2 horas antes do estímulo, com concentrações de 0,01, 0,1, e $1 \mu\text{g/ml}$ de extrato da *Malva sylvestris*.

As células foram estimuladas com LPS $1 \mu\text{g/ml}$ por 24h (Gutiérrez-Venegas et al.³⁹ 2006). A excitação e emissão de fluorescência máxima foram de 495 e 515 nm, respectivamente.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Os fibroblastos cultivados foram colocados na proporção de 2×10^6 células por poço (placa de 24 poços) e estimulados por 24 horas, com LPS, nas concentrações de 0,1, 0,3 e 1 $\mu\text{g/mL}$. Após sensibilização com LPS, a liberação de, IL-1 β e TNF- α pelos fibroblastos foram avaliadas separadamente por meio do método de ELISA segundo a técnica descrita por Brunius et al.¹¹³ (2005) por meio de um kit ELISA (R&D System, EUA) conforme instruções do fabricante. Após a verificação de qual concentração de LPS promove maior liberação de citocinas, novamente 2×10^6 células por poço foram incubadas com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) junto com a concentração de 0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidroalcolico de *M. sylvestris* por 24 horas e analisado a quantidade de citocinas.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de múltipla comparação de Newman – Keuls quando necessário. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism versão para Windows 3.00, São Diego, Califórnia, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 CONTROLE DE QUALIDADE DO MATERIAL BOTÂNICO

A fim de verificar se o material botânico adquirido pela Quimer Ervas Medicinais – São Paulo, de fato se tratava de *M. sylvestris*, as Folhas secas foram identificados com base em caracteres morfo-anatômicos descritos em monografias farmacopéica (Pharmacopoeia Helvetica¹¹⁴ 1993, Farmacopeia Brasileira¹¹⁵ 2000).

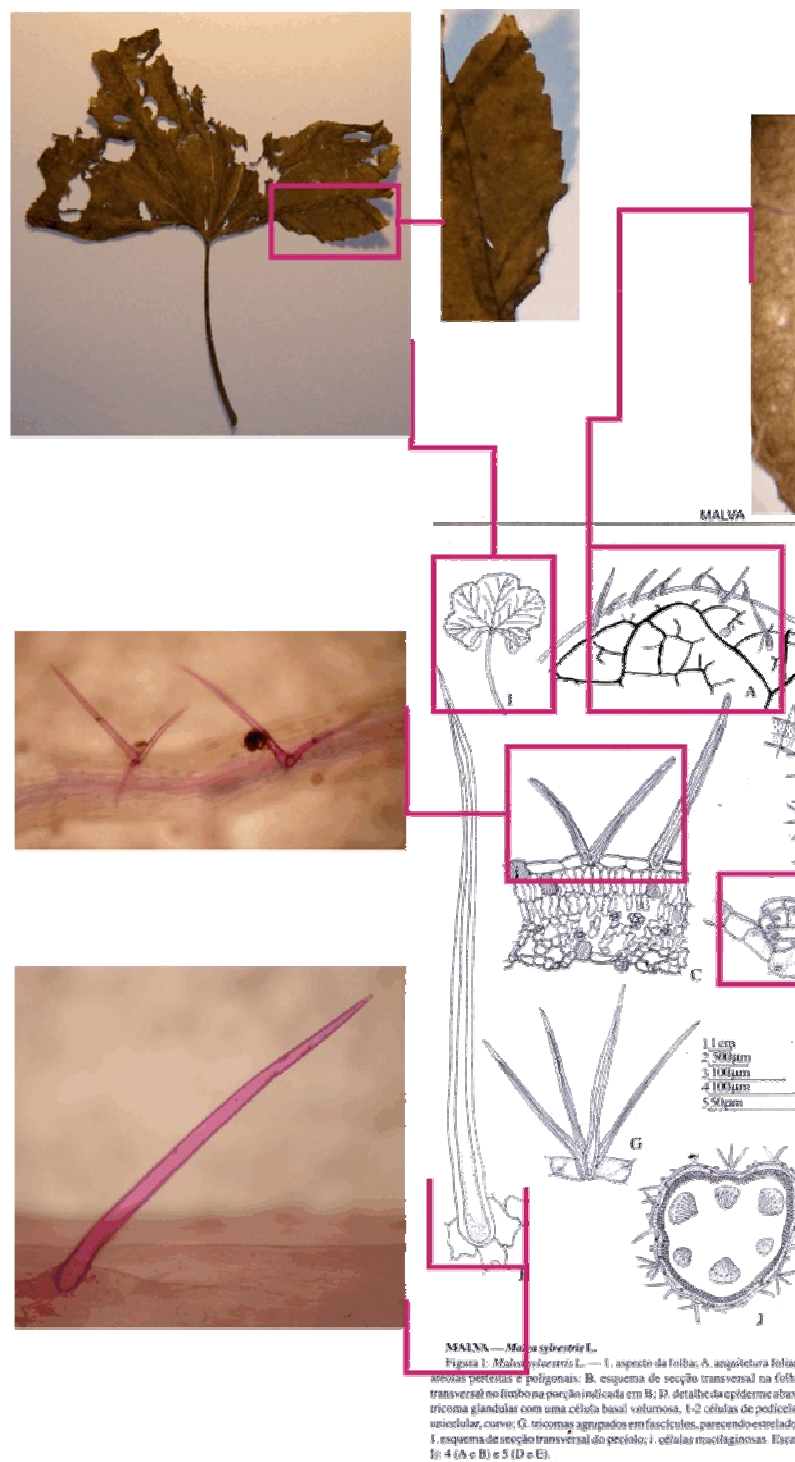


Figura 1: Fotografias de folhas secas de *M. sylvestris* comparativas com dados das monografias Farmacopéias.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO

5.2.1 Avaliação do método extrator

A maceração, o soxhlet e a turbólise, foram capazes de inibir o edema de orelha de forma significativa em 44, 45 e 46% respectivamente na maior dose testada (3,0 mg/orelha) (Gráfico 1), no entanto, foi escolhido para dar continuidade ao estudo o extrato extraído pelo método da Maceração pois foi o método capaz de demonstrar uma melhor atividade em menores doses testadas (Gráfico 2). Os extratos obtidos pelos métodos de Soxhlet e Turbólise também se demonstraram eficaz com inibição máxima de 45 e 46% respectivamente, e de forma dose dependente, porem não tiveram o mesmo desempenho quando extraído por maceração (Gráfico 2). O extrato obtido por infusão não foi capaz de extrair nenhum metabolito secundário com atividade de interesse (Gráfico 2).

Gráfico 1: Efeito dos diferentes métodos extratores e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA. O edema foi avaliado 6 h após a indução. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média com um N de 4-5 animais. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que *** $P < 0,001$ de significância.

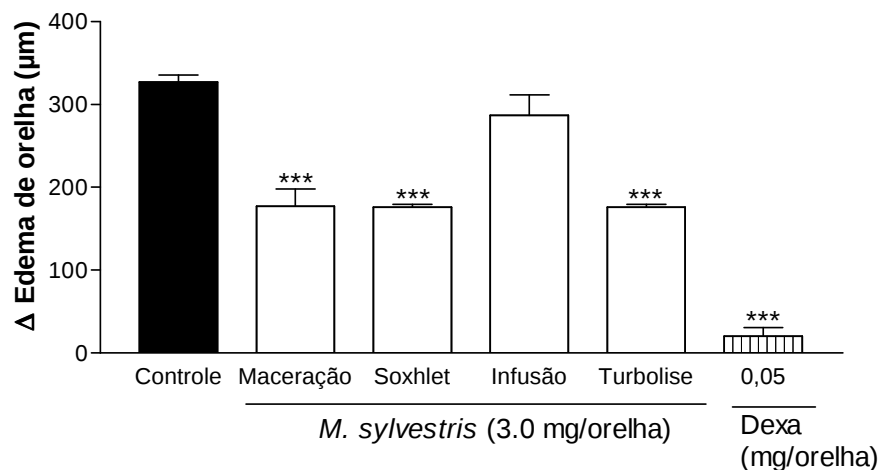
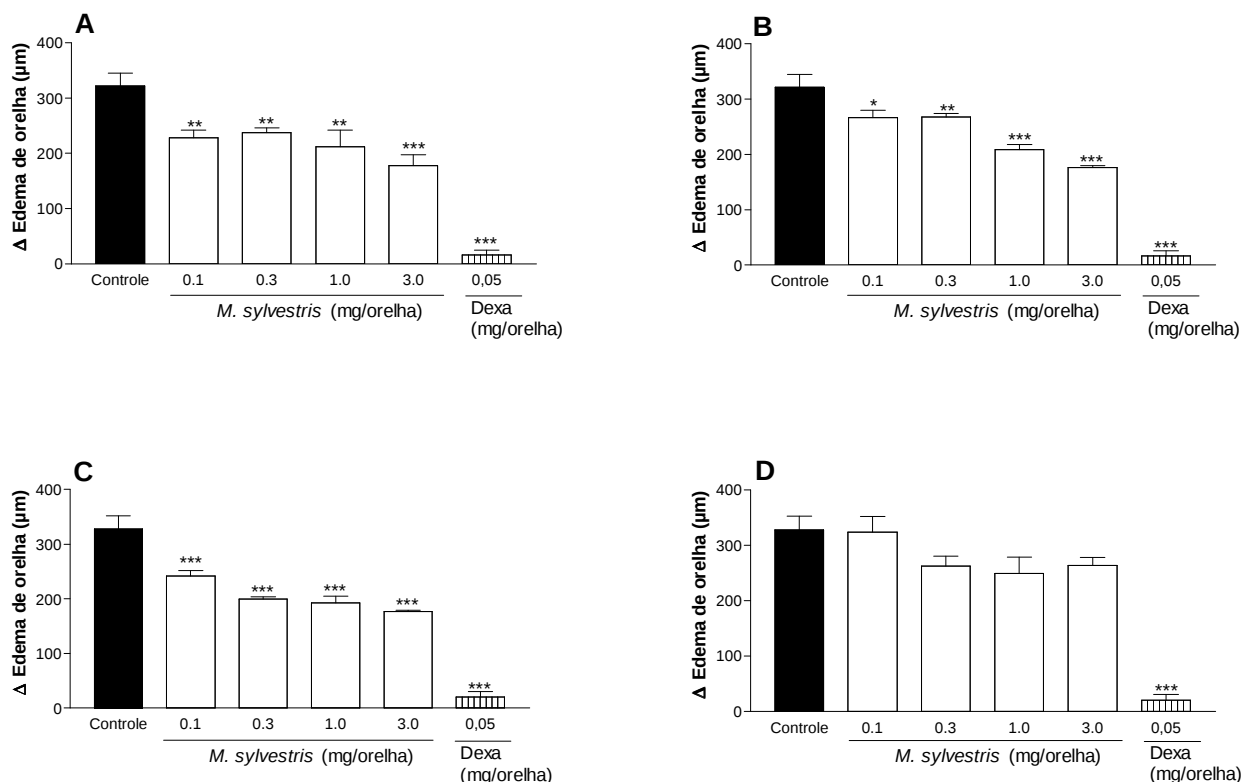


Gráfico 2: Efeito dos diferentes métodos extratores da *M. sylvestris* e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA. O edema foi avaliado 6h após a indução, Onde A é o efeito do extrato de maceração, B soxhlet C Turbólise e D a Infusão de *M. sylvestris*. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média com um N de 4 - 5 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa dos grupos em relação ao controle, sendo que, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.



5.2.2 Avaliação da concentração etanólica para extração

Os extratos 80 e 100% foram capazes de inibir a formação do edema em 51 e 50% aproximadamente, na dose de 3,0 mg/orelha enquanto o extrato de 90% conseguiu impedir a formação do edema em aproximadamente 20% (Fig. 3).

Os extratos de 80 e 100% apresentaram atividade muito próxima. A escolha foi pelo de 100% devido à facilidade de obtenção e também devido ao resultado obtido em doses de 1,0 mg/orelha, demonstrando que a eficácia do extrato de 100% é maior pois sua inibição foi de 50,69% (Gráfico 4) enquanto o de 80% foi de 38,08% (Gráfico 4).

Gráfico 3: Efeito dos diferentes extratos e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA. O edema foi avaliado 6 h após a indução. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média com um N de 4-5 animais. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ de significância.

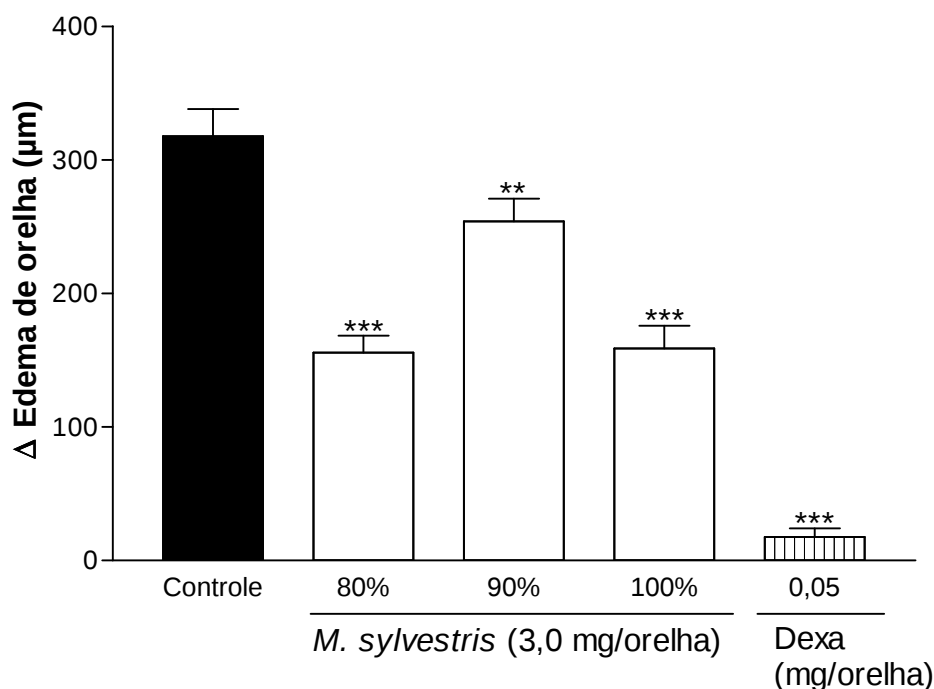
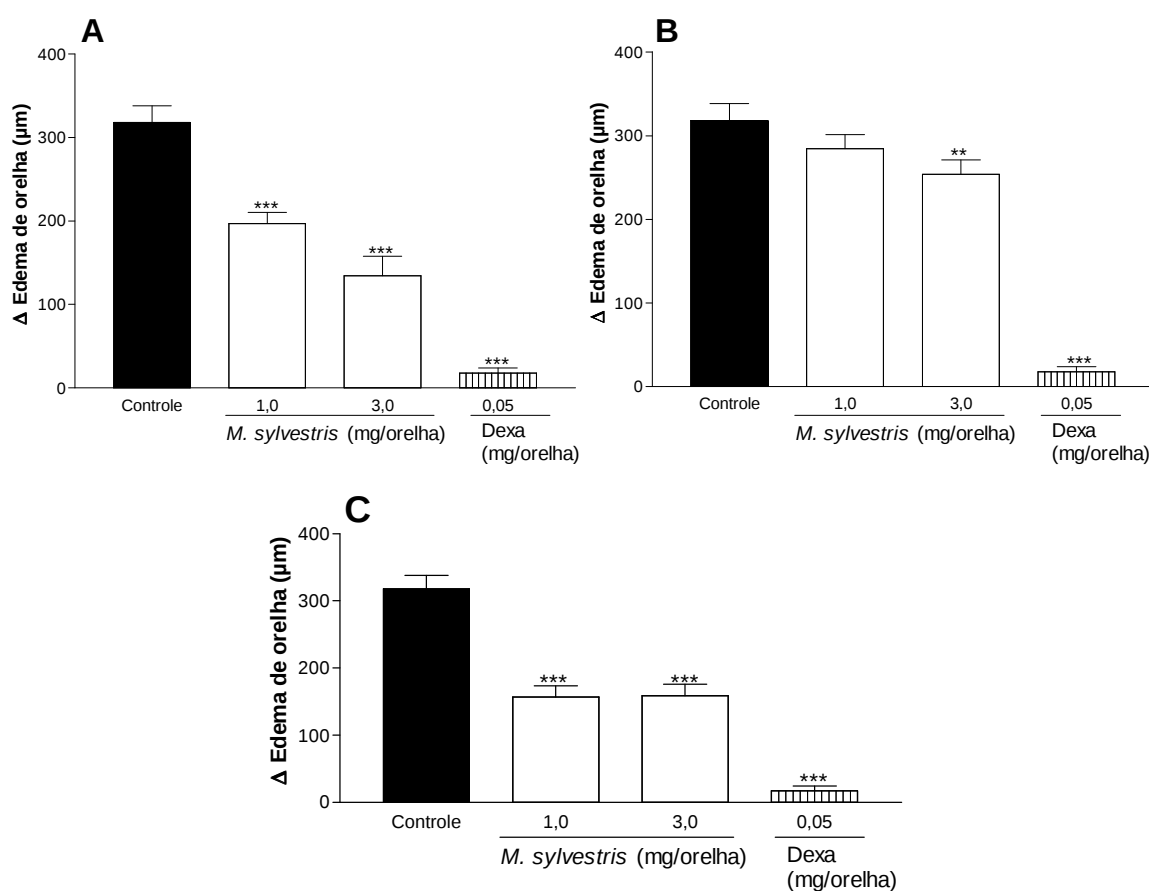


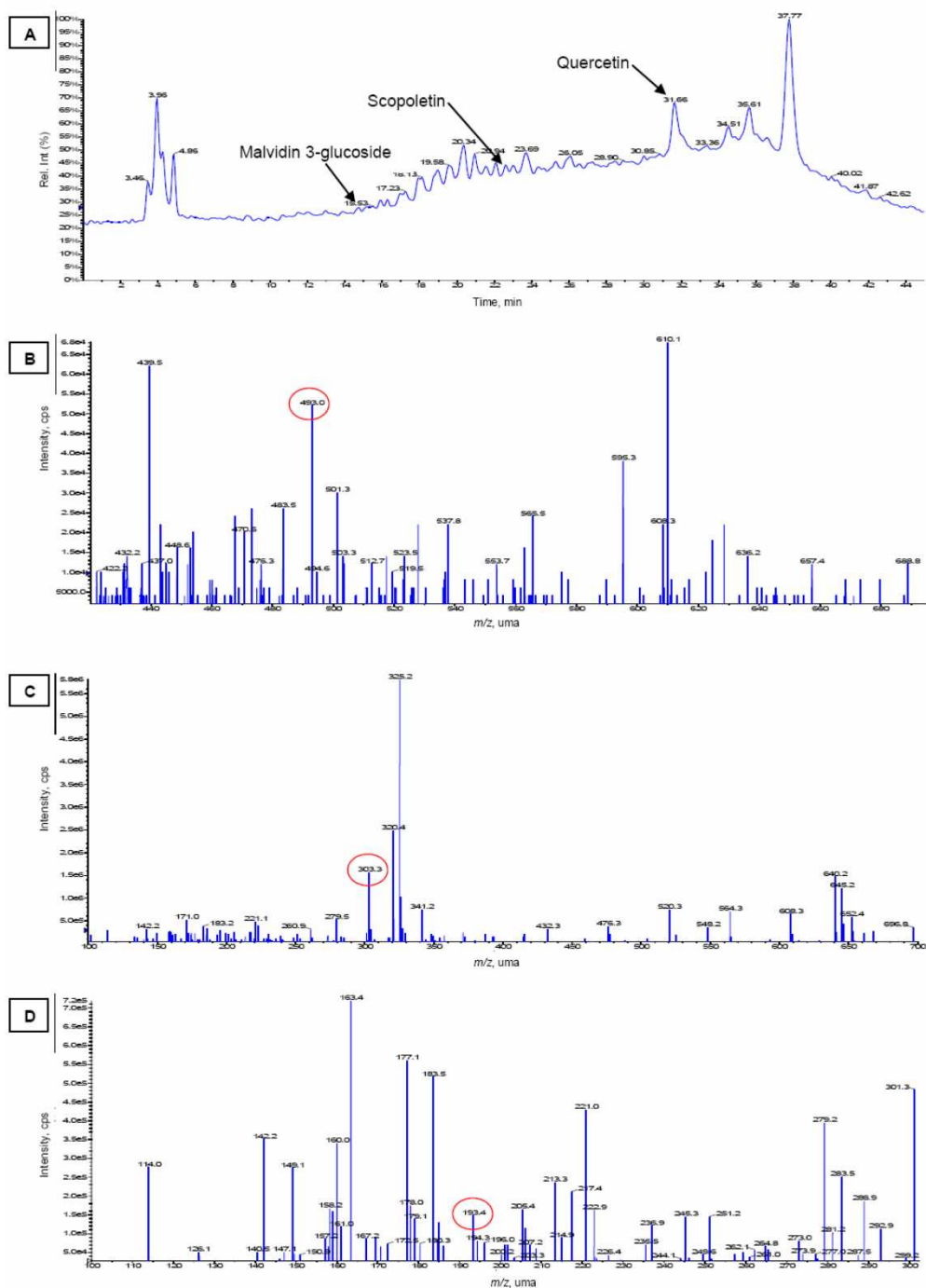
Gráfico 4: Efeito dos diferentes extratos da *M. sylvestris* e dexametasona (Dexa) administrado topicamente na indução do edema de orelha por TPA. O edema foi avaliado 6h após a indução, Onde **A** é o efeito do extrato de maceração 80% de etanol, **B** 90% e **C** 100%. Cada ponto representa a media $\pm$ erro padrão da média com um N de 4 - 5 animais. Os asteriscos representam a diferença significativa dos grupos em relação ao controle, sendo que, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.



5.3 PERFIL FITOQUIMICO DO EXTRATO

A análise do extrato hidroalcólico no modo positivo e negativo foi conduzida para ajustar as condições de LC-MS. Devido ao baixo teor de constituintes em estudo, o extrato hidroalcólico foi enriquecido. Quando os espectros de massa foram extraídos cromatograma de extrato hidroalcólico no mesmo tempo de retenção observado em cromatogramas dos padrões e extrato hidroalcólico foi verificada a presença de íons quasimolecular $[M + H]$ dos 193 m/z , m/z 303 em m/z 493, relativos à escopoletina, quercetina e malvidina 3-glucosídeo, respectivamente (Gráfico 5). Estes também foram confirmados no experimento de modo negativo, com exceção de malvidina 3 -glucosídeo. Outro metabólito detectado no modo positivo por íon m/z 318 foi omiricetina.

Gráfico 5: LC-ESI-MS a análise do extrato hidroalcoólico (HE) de *M. sylvestris*, de modo positivo: (A) cromatogramas do HE não perfurantes, (B) em espectro de massa. O tempo de retenção 14,7 min (malvidina 3 glucosídeo), (C) Espectro de massa extraída cromatograma da HE no tempo de retenção 22,6 min (escopoletina), (D) Espectro de massa extraída cromatograma da não HE retenção de 31,7 min tempo (quercetina).

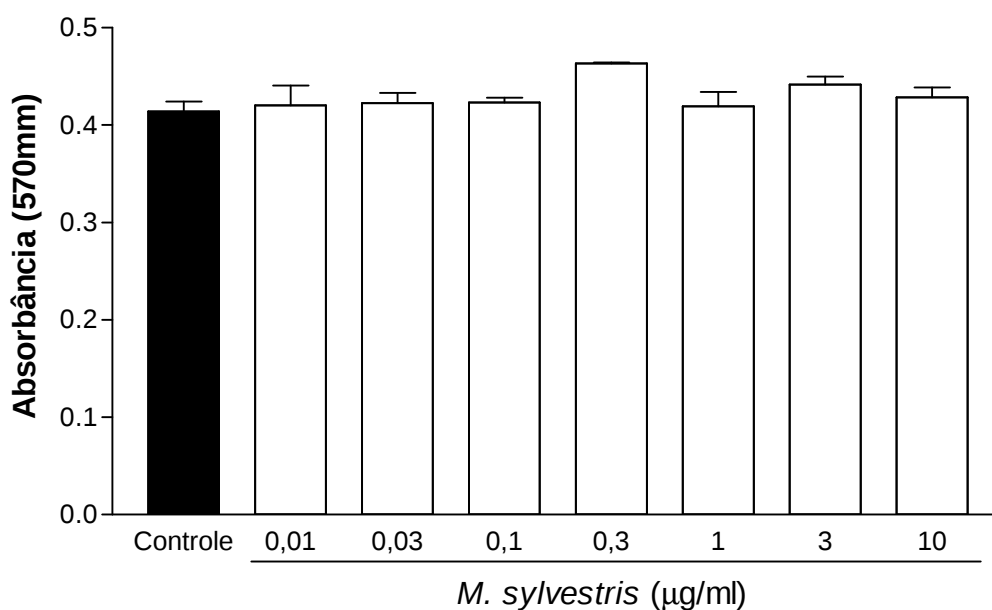


5.4 VERIFICAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

5.4.1 Ensaio do MTT

O Gráfico 6 mostra o efeito do extrato hidroalcoólico da *M. sylvestris* nas concentrações de 0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, e 10 µg/mL na viabilidade celular dos fibroblastos (3T3), análise feita após 24 horas de incubação do extrato. O extrato e o grupo controle não alteraram a viabilidade celular em 24 horas.

Gráfico 6: Viabilidade celular (média e desvio-padrão) avaliada pelo método MTT. O extrato hidroalcoólico bruto não promoveu alteração celular. Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos da *M. sylvestris* em relação ao grupo controle. (* $P < 0,05$; ANOVA).



5.5 VERIFICAÇÃO DA GENOTOXICIDADE

5.5.1 Ensaio do Cometa

O índice de dano visualizado através do ensaio cometa (Tabela 1) não mostrou diferença do grupo controle negativo (só células) média de dano igual a 2 em relação aos grupos testados do extrato hidroalcólico de *Malva sylvestris* 0,3, 1 e 3 µg/ml que também apresentaram dano igual a 2. No entanto, ambos os grupos de controle positivo (100µM e 125 µM) apresentaram o maior índice de dano igual 4.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre todas as concentrações estudadas de *Malva sylvestris* 0,3, 1 e 3 µg/ml quando comparadas ao grupo controle negativo, no entanto, o grupo controle positivo foi significativamente diferente dos demais (Figura 7).

Tabela 1 - Média do Escore no ensaio de cometa em cultura de células 3T3, os experimentos foram realizados em triplicata (n=3)

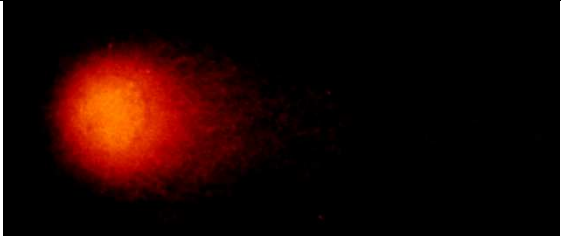
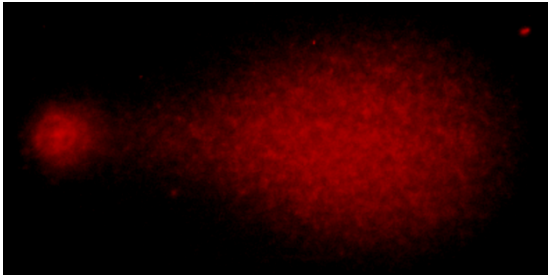
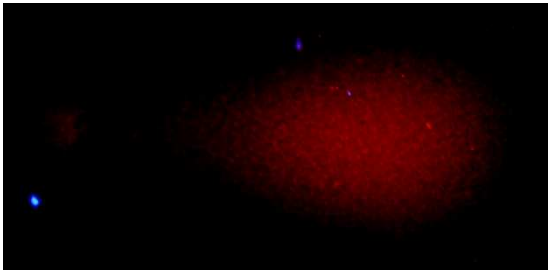
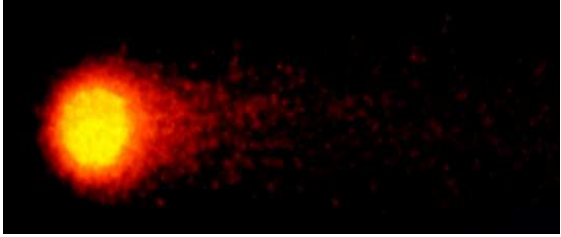
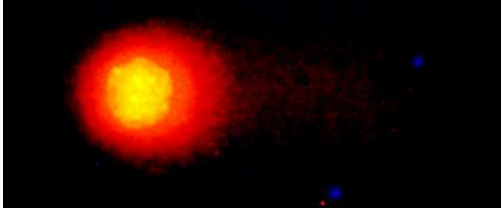
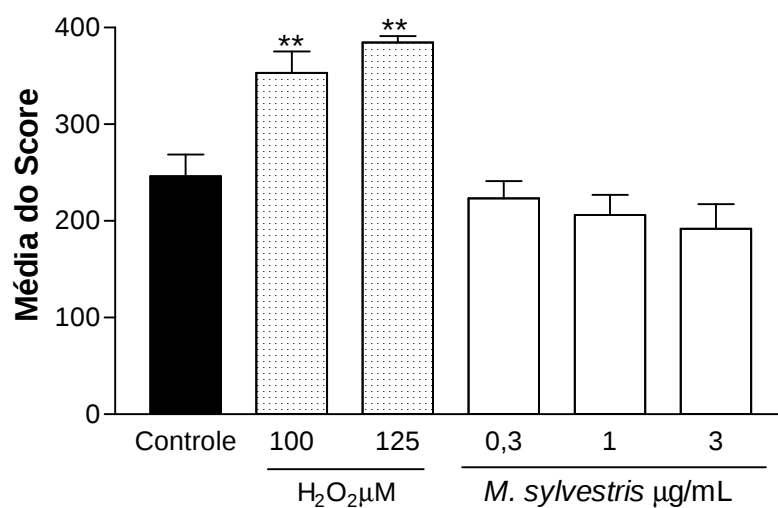
Grupo	Maior quantidade de dano	Formas Cometa característica/representativa, aumento 40X
Controle Negativo (só células) (3T3)	Dano 2	
Controle Positivo (H ₂ O ₂ 100 uM)	Dano 4	
Controle Positivo (H ₂ O ₂ 125 uM)	Dano 4	
Malva 0.3 ug/mL	Dano 2	
Malva 1 ug/MI	Dano 2	
Malva 3 ug/MI	Dano 2	

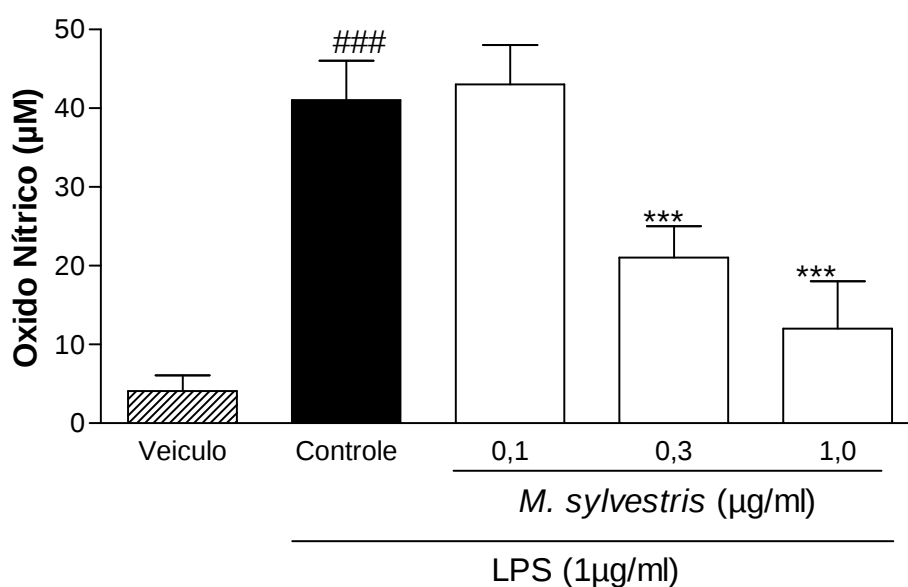
Gráfico 7: Média do Escore no ensaio de cometa em cultura de células 3T3, os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$). Como controle positivo dos experimentos foi utilizado H_2O_2 e tratados com *M. sylvestris*. Os asteriscos representam a diferença significativa dos grupos em relação ao controle, sendo que, $** P < 0,01$.



5.6 QUANTIFICAÇÃO DE NO

A incubação com LPS em fibroblastos 3T3 ocasionou um aumento na produção de Oxido Nítrico liberado no sobrenadante de cultura de forma diferente das células sem estimulação. O tratamento com o extrato hidroalcólico foi capaz de impedir a formação de oxido nítrico em $80 \pm 14\%$ na maior concentração utilizada em comparação ao grupo Controle.

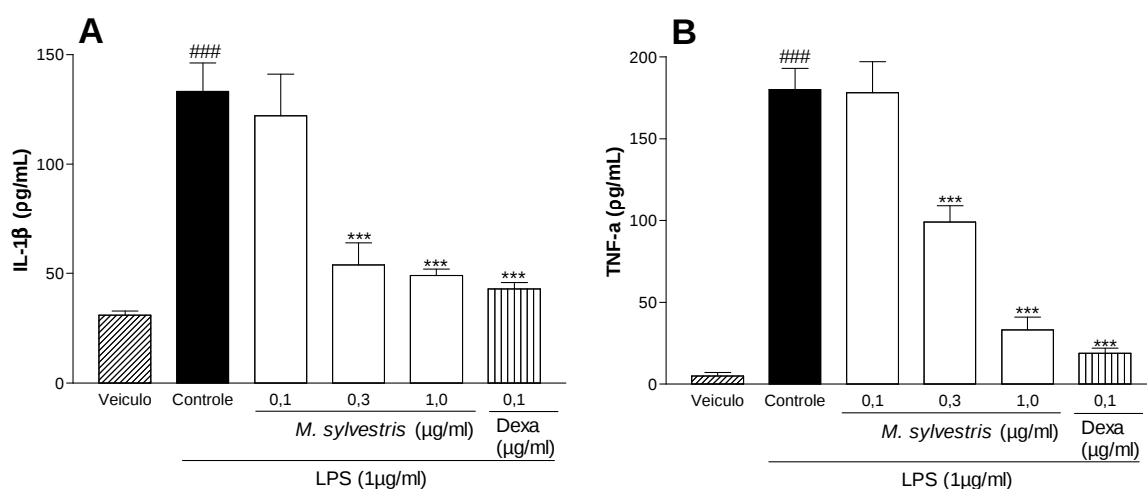
Gráfico 8: Efeito do extrato hidroalcólico de *M. sylvestris* e adicionado a fibroblastos 3T3 na produção Oxido Nítrico, estimulados por LPS. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que *** $P < 0,001$ de significância e # representa a diferença significativa entre os grupos Veiculo e Controle onde #### $P < 0,001$.



5.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

A estimulação de células 3T3 com LPS causou aumento significativo no nível de IL-1 β e TNF – α no sobrenadante das células em cultura (Gráfico 9). O aumento no nível de IL-1 β (Gráfico 9) no sobrenadante das células foi inibido pela adição do extrato hidroalcólico de *M. sylvestris*, sendo que, a concentração de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ foi capaz de inibir $86 \pm 2\%$. Os níveis aumentados de TNF – α em sobrenadante induzidos pelo LPS também foram reduzidos com o tratamento, onde a concentração de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ do extrato hidroalcólico de *M. sylvestris*, inibiu a liberação de TNF – α em $84 \pm 4\%$ (Gráfico 9). O tratamento com dexametasona (0,1 $\mu\text{g/ml}$) também causou redução do aumento no nível de IL-1 β e TNF- α provocado pelo LPS.

Gráfico 9: Efeito do extrato hidroalcólico de *M. sylvestris* e dexametasona (Dexa) adicionado a fibroblastos 3T3 na produção de IL-1 β (A) e TNF – α (B) estimulados por LPS. Cada ponto representa a média $\pm$ erro padrão da média. Os asteriscos representam a diferença dos grupos em relação ao controle, sendo que *** $P < 0,001$ de significância e # representa a diferença significativa entre os grupos Veículo e Controle onde ### $P < 0,001$



6 DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) a maior parte da população Mundial não tem acesso ao atendimento primário a saúde, o que torna as plantas medicinais a principal fonte de tratamento das enfermidades (Akerele¹¹⁸ 1993).

Para que ações farmacológicas benéficas da planta medicinal sejam obtidas de forma segura, é importante que sejam utilizados medicamentos elaborados com extrato empregado nos estudos científicos, ou seja, que haja uma padronização da droga vegetal. Em investigações científicas com o material botânico é importante o desenvolvimento de uma série de buscas: perfil etnobotânico, isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (fitoquímica) além da investigação farmacológica dos extratos e constituintes (Veiga Junior, Pinto, Maciel¹²⁰ 2005).

A grande preocupação é que, muitas vezes as plantas são consumidas sem o conhecimento ou comprovação de seus efeitos biológicos ou ainda comercializadas com a identificação errônea da planta tornando-se um problema sério de saúde pública. Órgãos de controle Sanitário estão implantando as primeiras regulamentações para o registro de fitoterápicos, pois não há meios de fiscalização que garantam um controle de qualidade das ervas comercializadas (Eisenberg¹¹⁹ 1998; Veiga Junior, Pinto, Maciel¹²⁰ 2005).

Neste contexto, como medida de biomonitoramento do hidroalcóolico da *Malva sylvestris* foi conduzido o teste de Genotoxicidade, ou seja, foi analisado o potencial do extrato da planta em causar lesões irreversíveis sobre a molécula de DNA dos fibroblastos. Nas concentrações testadas (0,3; 1 e 3 µg/ml) o extrato revelou segurança no uso não apresentando potencial mutagênico.

Para o presente estudo do extrato hidroalcóolico da *Malva sylvestris*, a qualidade do material botânico foi certificada por meio da análise macroscópica e microscópica executando-se fotografias das folhas secas da planta e posteriormente comparadas com caracteres morfo-anatômicos descritos nas farmacopéias. Algumas das características descritas foram: apresentação de raiz mondada, em vista frontal, células contendo mucilagem frequentemente ovaladas ou arredondadas, podendo

apresentar maior volume do que as demais parenquimáticas, adição de azul de toluidina os elementos de vaso adquiriram coloração azul intenso e as fibras coram de azul-claro entre outras características analisadas (Farmacopeia Brasileira¹¹⁴ 2000).

Para a análise quantitativa e qualitativa dos constituintes de plantas medicinais a extração é o primeiro caminho, ou seja, a separação dos compostos a serem analisados a partir da matriz celular. Atualmente, amplos espectros de procedimentos de extração estão sendo utilizados, os padrões de uso estão descritos nas Farmacopéias, havendo uma variedade: soxhlet, percolação, maceração, destilação a vapor entre outros (Pharmacopoeia Helvetica¹¹⁴ 1993; Farmacopeia Brasileira¹¹⁵ 2000).

Portanto, para o desenvolvimento do extrato desse estudo, várias formas extratoras foram testadas a fim de verificar qual delas seria capaz de extrair uma maior quantidade de metabólitos secundários da *M. sylvestris*, e assim ter sua maior atividade biológica. Para verificar a atividade biológica a *M. sylvestris*, foi submetida a quatro tipos de extração: Maceração, Soxhlet, Infusão e Turbólise, e após a total extração os quatro tipos de extratos foram avaliados através da redução de processo inflamatório agudo em orelha de camundongos.

Diversos modelos de inflamação têm sido desenvolvidos na literatura, porém os que apresentam modelos de pele apresentam algumas vantagens : o modelo de edema de orelha é um método simples e fácil que requer pouca quantidade de substâncias, fornece resultados reprodutíveis, rápidos e com baixas possibilidades de erros (Garbor⁹⁹ 2000). No presente trabalho, o modelo inflamatório cutâneo de edema de orelha induzido por TPA foi utilizado para teste de escolha do método extrator e da concentração etanólica do extrato.

A aplicação de TPA como agente flogístico, quando aplicado topicamente na pele de camundongos promove a indução de estresse oxidativo ou produção de espécies reativas de oxigênio e inflamação. O TPA é um dos principais ésteres do forbol, que gera uma resposta inflamatória aguda apresentando vasodilatação, infiltração de polimorfonucleares para o tecido e formação de edema podendo ocorrer uma hiperplasia epidermal (Garbor⁹⁹ 2000, Rauh¹²¹ et al. 2011).

Após desenvolvimento da metodologia de edema de orelha e tratamento do processo inflamatório com os extratos da *M. sylvestris*, os resultados mostraram que os métodos extratores Maceração, o Soxhlet e a Turbólise, foram

capazes de inibir o edema de forma significativa em 44, 45 e 46% respectivamente na maior dose testada (3,0 mg/orelha), no entanto foi escolhido para dar continuidade ao estudo o extrato extraído pelo método da Maceração pois ele foi capaz de demonstrar uma melhor atividade em doses menores (1,0 mg/orelha) sendo mais eficaz que os outros.

A necessidade de extrair componentes nutracêuticos de materiais vegetais exige novas tecnologias de extração ecologicamente e economicamente viáveis, pois os métodos tradicionais requerem grande quantidade de solvente. Novas técnicas estão sendo desenvolvidas como alternativa aos métodos convencionais de extração, oferecendo vantagens de extração, menor quantidade de solvente necessária, maior rendimento e reprodutibilidade. No entanto, essas novas técnicas de extração somente foram encontradas em um campo limitado de aplicações, exigindo novos estudos para melhor compreensão dos mecanismos de extração e das barreiras técnicas ainda existentes (García- Ayuso et al.¹²² 1998, Ong, Cheong, Goh¹²³ 2006).

Após a escolha da Maceração como método extrator, foi então verificado se a concentração de álcool utilizada alterava a atividade anti-edematogênica. para isso, três extratos (onde se variou a concentração de álcool) sendo essas concentrações de 80, 90 e 100% de etanol em água.

Os extratos 80 e 100% foram capazes de inibir a formação do edema em 51 e 50% aproximadamente, na dose de 3,0 mg/orelha então o extrato de 90% impediu a formação do edema em aproximadamente 20%. Como os extratos de 80 e 100% apresentaram uma atividade muito próxima, a escolha deu-se pelo extrato 100% devido à facilidade de obtenção e também devido o resultado obtido em doses de 1,0 mg/orelha, demonstrando que a eficácia do extrato de 100% é maior pois sua inibição foi de 50,69% enquanto o de 80% foi de 38,08%. Para controle positivo dos experimentos a Dexametasona, droga de referencia, foi utilizada.

Conforti et al.¹⁷ 2007 avaliaram a atividade anti-inflamatória tópica do extrato etanólico da *Malva sylvestris* (70%) em modelo de edema de orelha em camundongos. A aplicação tópica foi na concentração de 300 µg/cm² e os resultados revelaram uma redução do edema em 21%, assim como no presente estudo mostram atividade anti-edematogênica do extrato da planta.

Pensando na importância farmacológica da *M. sylvestris* alguns estudos têm sido realizados de diferentes partes da planta envolvendo o isolamento, identificação e quantificação dos compostos químicos. Entre os compostos existentes as mucilagens e as antocianinas são os compostos mais relevantes em relatos a propriedades farmacológicas (Billeter, Meier, Sticher²⁴ 1991, Pourrat, Texier, Barthomeuf²⁵ 1990).

Para o presente estudo foram conduzidas as análises de ESI-MS e LC-ESI-MS para explorar os íons representativos dos padrões de malvidin 3-glucosídeo quercetina e escopoletina, a fim de confirmar a presença ou ausência desses compostos no extrato hidroalcolico de *M. sylvestris*. Foi verificada a presença de íons quasimolecular $[M + H]$ dos 193 m/z , m/z 303 em m/z 493, relativos à escopoletina, quercetina e malvidin 3-glucosídeo, respectivamente. Estes também foram confirmados no experimento de modo negativo, com exceção de malvidina 3 -glucosídeo. Outro metabólito detectado no modo positivo por íon m/z 318 foi omiricetina.

Investigações foram conduzidas por outros autores: Takeda¹²⁴ et al. (1989), Pourrat, Texier, Barthomeuf²⁵ (1990); Farina et al.¹²⁵ (1995), aonde caracterizaram flavonóides em folhas e flores da *M. sylvestris*, mostrando resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho. Nas flores foram encontradas principalmente antocianinas, tais como: malvidina 3,5 diglucosídeo (Malvina) que ocorreu especialmente sob a forma de íons catiônicos e, além disso, malvidina 3 – glucosídeo foram identificados nas flores.

Apesar da *M. sylvestris* ser amplamente conhecida na cultura popular, literatura científica é escassa na análise de suas propriedades biológicas e químicas. O presente trabalho procurou verificar sua ação em modelo inflamatória de cultura de células *in vitro* através da estimulação com LPS.

A doença periodontal é caracterizada por um processo inflamatório que conduz a uma alta secreção contínua de citocinas como interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), bem como de prostaglandina E2 (PGE2) e NO pelas células hospedeiras, seguidas de estimulação por periodontopatógenos e seus produtos, é um determinante crítico da destruição do tecido periodontal (Okada, Murakami et al.⁴² 1998, Birkedal-Hansen⁵⁶ 1993, Bodet Chandad, Grenier et al.⁶⁶ 2007).

A estimulação com LPS em fibroblastos 3T3 ocasionou um aumento na produção de Óxido Nítrico liberado no sobrenadante de cultura de forma diferente das células sem estimulação. O tratamento com o extrato hidroalcolico foi capaz de impedir a formação de NO em $80 \pm 14\%$ na maior concentração utilizada em comparação ao grupo controle.

As prostaglandinas e o óxido nítrico são importantes mediadores pró-inflamatórios envolvidos tanto em processos benéficos quanto prejudiciais aos tecidos (Moncada, Palmer, Higgs¹²⁶ 1991). No ambiente da doença periodontal, a presença de estímulos inflamatórios é capaz de induzir a produção de NO pelas células inflamatórias, através do aumento da expressão da enzima iNOS. A presença de quantidades elevadas de L-arginina e L-citrulina em tecido gengival inflamado *in vivo* (Matejka et al.⁵¹ 1998) e a expressão da iNOS macrófagos, linfócitos e neutrófilos polimorfonucleares (PMN) na periodontite induzida experimentalmente em ratos (Lohinai et al.¹²⁸ 1998) bem como macrófagos e células endoteliais na periodontite humana sugere a produção e participação do NO no desenvolvimento do processo de doença (Lappin et al.¹²⁷ 2000). No presente estudo, o extrato da *M. sylvestris* inibiu a liberação de NO em 80% na maior concentração testada em fibroblastos estimulados por produtos bacterianos, o que pode sugerir uma possível via de ação da planta.

A estimulação de células 3T3 com LPS causou aumento significativo no nível de IL-1 β e TNF – α no sobrenadante das células em cultura. O aumento no nível de IL-1 β no sobrenadante das células foi inibido pela adição do extrato hidroalcolico de *M. sylvestris*, sendo que, a concentração de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ foi capaz de inibir $86 \pm 2\%$. Os níveis aumentados de TNF – α em sobrenadante induzidos pelo LPS também foram reduzidos com o tratamento, onde a concentração de 1,0 $\mu\text{g/ml}$ do extrato hidroalcolico de *M. sylvestris*, inibiu a liberação de TNF – α em $84 \pm 4\%$. O tratamento com dexametasona (0,1 $\mu\text{g/ml}$) também causou redução do aumento no nível de IL-1 β e TN- α provocado pelo LPS.

Muitos estudos tem demonstrado que a elevada expressão de IL-1 no fluido gengival estão associados à doença periodontal severa. Além do mais, o nível de IL-1 β aumenta rapidamente em casos de gengivite e IL-1 β é produzida pelas inúmeras células da área periodontal, incluindo monócitos, fibroblastos gengivais e polimorfonucleares. IL-1 β regula o fenótipo do fibroblasto (Stashenko et al.¹²⁸ 1991). Assuma et al.¹²⁹ (1998), mostra que o local de inibição de ambos IL-1 e

TNF- α nos tecidos periodontais reduzem significativamente em macacos com doença induzida através de ligaduras e mensurações histológicas mostram 75% de redução osteoclástica e 40% de redução de perda óssea em macacos com ligaduras comparados com os animais tratados com placebo.

As citocinas estão diretamente envolvidas na progressão da doença periodontal, são produzidas por diferentes células que participam nos mecanismos de defesa como: macrófagos, células T, células B, linfócitos/monócitos, natural killer (NK), etc. A IL-1a, IL-1b, TNF- α , TNF- β , interferon γ (IFN γ) etc, são as principais citocinas produzidas. Células predominantes produzindo IL-1b são ativadas, sendo a maioria das citocinas associadas com a reabsorção óssea e remodelação. O TNF- α é encontrado na fase de destruição óssea ou em estágio avançado de periodontite (Lundy, Linden 2004¹³⁰; Orozco et al.¹³¹ 2007) . No presente estudo foi possível verificar que após a indução de processo inflamatório em cultura de células, o tratamento com o extrato da *Malva sylvestris* conseguiu inibir a liberação das citocinas testadas IL-1b e TNF- α , mostrando uma perspectiva de compreensão da via de ação da planta.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que o extrato hidroalcóolico da *Malva sylvestris*:

- Os métodos extratores da *M. sylvestris*: Maceração e Turbólise apresentaram melhor atividade anti-edematogênica em menores doses testadas;
- A concentração etanólica de 100% foi a que apresentou melhor capacidade de inibição de edema em menores doses testadas;
- As análises cromatográficas confirmaram a presença dos compostos malvidina 3-glucosídeo, quercetina e escopoletina no EEMS.
- O EEMS não alterou a viabilidade celular;
- O EEMS não apresentou atividade mutagênica;
- O tratamento com o extrato hidroalcóolico foi capaz de impedir a formação de NO;
- O tratamento com EEMS causou redução nos níveis de IL-1 β e TNF- α provocado por LPS.

Através deste estudo foi possível verificar a melhor forma extratora e concentração etanólica para o extrato de *Malva sylvestris* com atividade anti-edematogênica. Em estudo prévio o EEMS bem como as frações e resina, apresentou atividade anti-inflamatória por via tópica em modelo de inflamação de pele. A avaliação em cultura de células sugere a interferência do extrato nas citocinas IL-1 β e TNF- α , o que gera necessidade de outras metodologias a fim de investigar o mecanismo celular e molecular sobre a qual a planta exerce o efeito anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS*¹

- 1 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Coordenação Nacional de Saúde Bucal. Projeto SB Brasil 2003. Condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003. Resultados Principais. Brasília: Ministério da Saúde; 2004.
- 2 Azarpazhooh A, Shah PS, Tenenbaum HC, Goldberg MB. The management of inflammation in periodontal disease. J Periodontol. 2010 Jan;81(1):4-14.
- 3 Heller RA, Schena M, Chai A, Shalon D, Bedilion T, Gilmore J, Woolley DE, Davis RW. Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Mar 18;94(6):2150-5.
- 4 Bodet C, La VD, Epifano F, Grenier D. Naringenin has anti-inflammatory properties in macrophage and ex vivo human whole-blood models. J Periodontal Res. 2008 Aug;43(4):400-7.
- 5 Park SY, Shin SY, Yang SM, Kye SB. Factors influencing the outcome of root-resection therapy in molars: a 10-year retrospective study. J Periodontol. 2009 Jan;80(1):32-40.
- 6 Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. Periodontol 2000. 1997 Jun;14:9-11.
- 7 Faveri M, Feres M, Gursky LC, Martins VN, Caixeta Neto LS, Figueiredo LC. Supragingival plaque control on non-surgery periodontal therapy. Rev Odontol UNESP. 2006; 35(4): 313-8.
- 8 Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1997 May;24(5):324-34 .
- 9 Cugini MA, Haffajee AD, Smith C, Kent RL Jr, Socransky SS. The effect of scaling and root planing on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases: 12-month results. J Clin Periodontol. 2000 Jan;27(1):30-6.
- 10 Cobb CM. Clinical significance of non-surgical periodontal therapy: an evidence-based perspective of scaling and root planing. J Clin Periodontol. 2002 May;29 Suppl 2:6-16.
- 11 Van Dyke TE. The management of inflammation in periodontal disease. J Periodontol. 2008 Aug;79(8 Suppl):1601-8.
- 12 Fernandes Junior A; Lopes MMR; Colombari V; Monteiro ACMM ; Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellífera* de três regiões do Brasil. Cienc.Rural. 2006 Jan 36(1): 294-297.

¹ De acordo com as Normas do Programa de Mestrado em Odontologia da UEPG baseado no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

- 13 El Ghaoui WB, Ghanem EB, Chedid LA, Abdelnoor AM. The effects of *Alcea rosea* L., *Malva sylvestris* L. and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice. *Phytother Res*. 2008 Dec;22(12):1599-604.
- 14 Kaileh M, Vanden Berghe W, Boone E, Essawi T, Haegeman G. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. *J Ethnopharmacol*. 2007 Sep 25;113(3):510-6.
- 15 Henry AG, Piperno DR. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqā'i, Syria. *J Archaeol Sci* 2008 35: 1943-1950.
- 16 DellaGreca M, Cutillo F, D'Abrosca B, Fiorentino A, Pacifico S, Zarrelli A. Antioxidant and radical scavenging properties of *Malva sylvestris*. *Nat Prod Commun*. 2009 Jul;4(7):893-6.
- 17 Conforti F, Ioele G, Statti GA, Marrelli M, Ragno G, Menichini F. Antiproliferative activity against human tumor cell lines and toxicity test on Mediterranean dietary plants. *Food Chem Toxicol*. 2008 Oct;46(10):3325-32. Epub 2008 Aug 15.
- 18 Chiclana CF, Enrique A, Consolini AE. Topical Antiinflammatory Activity of *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) on Carragenin-induced Edema in Rats. *Lat Am J Pharm* 2009 28: 275-278.
- 19 Daniela A, Pichichero E, Canuti L, Cicconi R, Karou D, D'Arcangelo G, Cantini A. Identification of phenolic compounds from medicinal and melliferous plants and their cytotoxic in cancer cells. *Caryologia* 2007 60: 90-95.
- 20 Tomoda M, Gonda R, Shimizu N, Yamada H. Plant mucilages. XLII. An anti-complementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritanica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1989 Nov;37(11):3029-32.
- 21 Barros L, Carvalho AM, Ferreira IC. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food Chem Toxicol*. 2010 Jun;48(6):1466-72.
- 22 Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol*. 2008 Aug 13;118(3):418-28. Epub 2008 May 13.
- 23 Sleiman NH, Daher CF. *Malva sylvestris* water extract: A potential anti-inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. 57th International Congress and Annual Meeting of the GA 2009 . August 16-20. Geneva, Switzerland.
- 24 Billeter M, Meier B, Sticher O. 8-hydroxyflavonoid glucuronides from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry* 1991 30: 987-990.
- 25 Pourrat H, Texier O, Barthomeuf C. Identification and assay of anthocyanin pigments in *Malva sylvestris* L. *Pharm Acta Helv* 1990 65: 93-96.

- 26 Classen B, Blaschek W. An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*. *Planta Med.* 2002 Mar;68(3):232-6.
- 27 Saito T, Ishihara K, Ryu M, Okuda K, Sakurai K. Fimbriae-associated genes are biofilm-forming factors in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2010;51(3):145-50..
- 28 Haffajee AD, Socransky SS. Periodontal Microbial ecology. *Periodontol* 2000. 2005; 38:135-87.
- 29 Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol* 2003; 30 Suppl 5:7-9.
- 30 Carranza N, Takei H, Newman MG, Klokkevold PR. *Periodontia clínica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier ; 2007.
- 31 Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997 Jun;14:12-32.
- 32 Bodet C, Chandad F, Grenier D. Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci.* 2007 Feb;115(1):64-70.
- 33 Fort P, Marty L, Pichaczyk M, Sabrout SE, Dani C, Jeanteur P. et al. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 1985 Mar 11;13(5):1431-42.
- 34 Lima HR, Gelani V, Fernandes AP, Gasparoto TH, Torres SA, Santos CF et al. The essential role of toll like receptor-4 in the control *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. *J Clin Periodontol.* 2010 Mar;37(3):248-54.
- 35 Waga I, Nakamura M, Honda Z, Ferby I, Toyoshima S, Ishiguro S, Shimizu T. Two distinct signal transduction pathways for the activation of guinea-pig macrophages and neutrophils by endotoxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Dec 15;197(2):465-72.
- 36 Han J, Lee JD, Tobias PS, Ulevitch RJ. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem.* 1993 Nov 25;268(33):25009-14.
- 37 Weinstein SL, Sanghera JS, Lemke K, DeFranco AL, Pelech SL. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):14955-62.
- 38 Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* 1994 Dec 22-29;372(6508):739-46.

- 39 Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frías S. Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol.* 2006 Jul 10;541(1-2):95-105.
- 40 Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiol Rev.* 1996 Jun;60(2):316-41.
- 41 Jorge AO. *Microbiología Bucal*. 2. Ed. Santos, 1998.
- 42 Okada H, Murakami S. Cytokine expression in periodontal health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998 Jan; 9(3):248-66.
- 43 Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab Invest.* 1976 Mar;34(3):235-49.
- 44 Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 1987 Dec 4;51(5):813-9.
- 45 Lindhe J, Helldén L. Neutrophil chemotactic activity elaborated by dental plaque. *J Periodontal Res.* 1972;7(4):297-303.
- 46 Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1991 May;26(3 Pt 2):230-42.
- 47 Alexander MB, Damoulis PD. The role of cytokines in the pathogenesis of periodontal disease *Curr Opin Periodontol.* 1994:39-53.
- 48 Henderson B, Poole S, Wilson M. Microbial/host interactions in health and disease: who controls the cytokine network? *Immunopharmacology.* 1996 Oct;35(1):1-21.
- 49 Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. *Oral Dis.* 2001 Jan;7(1):2-10
- 50 Uğar-Cankal D, Ozmeric N. A multifaceted molecule, nitric oxide in oral and periodontal diseases. *Clin Chim Acta.* 2006 Apr;366(1-2):90-100.
- 51 Matejka M, Partyka L, Ulm C, Solar P, Sinzinger H. Nitric oxide synthesis is increased in periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1998 Nov;33(8):517-8.
- 52 Irwin CR, Schor SL, Ferguson MW. Expression of EGF-receptors on epithelial and stromal cells of normal and inflamed gingival. *J Periodontal Res.* 1991 Sep;26(5):388-94.
- 53 Yanti, Hwang JK. Suppressive effect of ethanolic *Kaempferia pandurata* Roxb. extract on matrix metalloproteinase-2 expression in *Porphyromonas gingivalis*-treated human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Sci.* 2010 Dec;52(4):583-91.

- 54 Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997 Jun;14:33-53.
- 55 Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2004 Aug;72(8):4689-98.
- 56 Birkedal-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*. 1993 Nov;28(6 Pt 2):500-10.
- 57 Suomalainen K, Sorsa T, Uitto VJ, Vauhkonen M, Lindy S. Characteristics of neutral proteases present in inflamed human gingiva. *Scand J Dent Res*. 1989 Aug;97(4):346-54.
- 58 Heath JK, Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Human gingival tissues in culture synthesize three metalloproteinases and a metalloproteinase inhibitor. *J Periodontal Res*. 1982 Mar;17(2):183-90.
- 59 Salonen J, Uitto VJ, Pan YM, Oda D. Proliferating oral epithelial cells in culture are capable of both extracellular and intracellular degradation of interstitial collagen. *Matrix*. 1991 Feb;11(1):43-55.
- 60 Sorsa T, Uitto VJ, Suomalainen K, Vauhkonen M, Lindy S. Comparison of interstitial collagenases from human gingiva, sulcular fluid and polymorphonuclear leukocytes. *J Periodontal Res*. 1988 Nov;23(6):386-93.
- 61 Pöllänen MT, Salonen JI, Uitto VJ. Structure and function of the tooth-epithelial interface in health and disease. *Periodontol 2000*. 2003;31:12-31.
- 62 DeSanctis M, Murphy KG. The role of resective periodontal surgery in the treatment of furcation defects. *Periodontol 2000*. 2000 Feb;22:154-68.
- 63 Seymour RA, Heasman PA. Drugs and the periodontium. *J Clin Periodontol*. 1988 Jan;15(1):1-16.
- 64 Ara T, Kurata K, Hirai K, Uchihashi T, Uematsu T, Imamura Y, Furusawa K, Kurihara S, Wang PL. Human gingival fibroblasts are critical in sustaining inflammation in periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2009 Feb;44(1):21-7.
- 67 Kornman KS, di Giovine FS. Genetic variations in cytokine expression: a risk factor for severity of adult periodontitis. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):327-38.
- 68 Salvi GE, Beck JD, Offenbacher S. PGE2, IL-1 beta, and TNF-alpha responses in diabetics as modifiers of periodontal disease expression. *Ann Periodontol*. 1998 Jul;3(1):40-50.
- 69 Kinane DF, Chestnutt IG. Smoking and periodontal disease. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2000;11(3):356-65.
- 70 Albandar JM. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2002;29:177-206.

- 71 Salvi GE, Lang NP. Host response modulation in the management of periodontal diseases. *J Clin Periodontol*. 2005;32 Suppl 6:108-29.
- 72 Golub LM, Suomalainen K, Sorsa T. Host modulation with tetracyclines and their chemically modified analogues. *Curr Opin Dent*. 1992 Mar;2:80-90.
- 73 Bartold PM, Cantley MD, Haynes DR. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 Jun;53:55-69.
- 74 Gurgel BCV, Pinto FR, Sallum EA; Notici FHJ; Casati MZ; Toledo S. de. Perspectivas da Utilização de Antiinflamatórios não Esteroidais na Terapia Periodontal. *Rev Periodontia*. 2004;14,Jun; 12-16.
- 75 Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1994 Aug;9(4):202-8.
- 76 Tipton DA, Hamman NR, Dabbous MKh. Effect of myrrh oil on IL-1beta stimulation of NF-kappaB activation and PGE(2) production in human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2006 Mar;20(2):248-55. Epub 2005 Aug 19.
- 77 Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *RBCF* 2006 jun;42(2): 289-306.
- 78 Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no.48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápico junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária.DOU. Diário Oficial da União, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.
- 79 Cao CF, Sun XP. Herbal medicine for periodontal diseases. *Int Dent J*. 1998 Jun;48(3 Suppl 1):316-22.
- 80 Lorenzi H, Matos FJ. Plantas Medicinais no Brasil – nativas e exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa-SP 2002.
- 81 Ogura N et al. Stimulation of interleukin-6 production of periodontal ligament cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *Biochem Med Metab Biol*. 1994 Dec;53(2):130-6.
- 82 Watanabe A, Takeshita A, Kitano S, Hanazawa S. CD14-mediated signal pathway of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Infect Immun*. 1996 Nov;64(11):4488-94.
- 83 Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frías S. Luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol*. 2006 Jul 10;541(1-2):95-105. Epub 2006 Apr 5.
- 85 Novais MH, Santos I, Mendes S, Pinto-Gomes C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *J Ethnopharmacol*. 2004 Aug;93(2-3):183-95.

- 86 Ferreira A, Proença C, Serralheiro ML, Araújo ME. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol.* 2006 Nov 3;108(1):31-7. Epub 2006 Apr 28.
- 87 Passalacqua NG, Guarrera PM, De Fine G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia.* 2007 Jan;78(1):52-68. Epub 2006 Sep 23.
- 88 Guarrera PM, Forti G, Marignoli S. Ethnobotanical and ethnomedicinal uses of plants in the district of Acquapendente (Latium, Central Italy). *J Ethnopharmacol.* 2005 Jan 15;96(3):429-44.
- 89 Ishtiaq M, Hanif W, Khan MA, Ashraf M, Butt AM. An ethnomedicinal survey and documentation of important medicinal folklore food phytonims of flora of Samahni valley, (Azad Kashmir) Pakistan. *Pak J Biol Sci.* 2007 Jul 1;10(13):2241-56.
- 90 Scherrer AM, Motti R, Weckerle CS. Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *J Ethnopharmacol.* 2005 Feb 10;97(1):129-43
- 91 El Beyrouthy M, Arnold N, Delelis-Dusollier A, Dupont F. Plants used as remedies antirheumatic and antineuralgic in the traditional medicine of Lebanon. *J Ethnopharmacol.* 2008 Dec 8;120(3):315-34.
- 92 Pollio A, De Natale A, Appetiti E, Aliotta G, Touwaide A. Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. *J Ethnopharmacol.* 2008 Mar 28;116(3):469-82.
- 93 Idolo M, Motti R, Mazzoleni S. Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines). *J Ethnopharmacol.* 2010 Feb 3;127(2):379-95
- 95 Paquette DW, Williams RC. Modulation of host inflammatory mediators as a treatment strategy for periodontal diseases. *Periodontol 2000.* 2000 Oct;24:239-52.
- 96 Rackova L et al. Structural aspects of antioxidant action of selected natural. *Free Rad. Res* 2009. 43,27-97.
- 97 Locato V, Pinto MC, Gadaleta C, De Gara. Ascorbate metabolism as critical point for the activation of programmed cell death in plants. *Free Rad Res* 2009. 43, 27-97.
- 98 Cutillo F, D'Abrosca B, Dellagreca M, Fiorentino A, Zarrelli A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. *Phytochemistry.* 2006 Mar;67(5):481-5. Epub 2006 Jan 5.
- 99 Gàbor M. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Budapest: Akadémiai Kiadó, 2000.

- 100 Winyard PG. Key stages in the acute inflammatory response and their relevance as therapeutic targets. In: Winyard PG e Willoughby DA. *Inflammation Protocols*, New Jersey: Hum Pres, p.3-4, 2003.
- 101 Young JM, Spires DA, Bedord CJ, Wagner B, Ballron SJ, De Young LM. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J Inv Derm*, v.82, p.367-371, 1984.
- 102 Keila S, Nemcovsky CE, Moses O, Artzi Z, Weinreb M. In vitro effects of enamel matrix proteins on rat bone marrow cells and gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2004 Feb;83(2):134-8.
- 103 Doyle A, Griffiths JB. *Cell and tissue culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, 1998.
- 104 Silva TMA, Aoyama H, Haun M, Ferreira CV. Citotoxicidade promovida pelo promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. *RBAC* 2004. 36(4): 237-239.
- 105 Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):206-21.
- 106 Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 Aug 30;123(1):291-8.
- 107 Olive PL. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Radiat Res*. 1989 Jan;117(1):79-92.
- 108 Olive PL, Banáth JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*. 1990 Apr;122(1):86-94.
- 109 Coura GS. Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA. [Dissertação] Mestrado em odontologia- Implantodontia. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.
- 110 Itoh Y, Ma FH, Hoshi H, Oka M, Noda K, Ukai Y, Kojima H, Nagano T, Toda N. Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diaminofluorescein fluorometry. *Anal Biochem*. 2000 Dec 15;287(2):203-9.
- 111 Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1999 Nov 2;38(21):3209-3212.
- 112 Balcerczyk A, Soszynski M, Bartosz G. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 2005 Aug 1;39(3):327-35.

- 113 Brunius G, Domeij H, Gustavsson A, Yucel-Lindberg T. Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *Regul Pept.* 2005 Mar 30;126(3):183-8.
- 114 Pharmacopoeia Helvetica. 7th ed. Berne, Département Fédéral de L'Intérieur ; 1993.
- 115 Farmacopéia Brasileira. 4th ed. São Paulo: Atheneu; 2000.
- 116 Burlinson, B et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res.* 2007 627: 31-35.
- 117 Hartmann A, Speit, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett.* 1997 (90) 183-188.
- 118 Akerele O. Summary of WHO guidelines for assesment of herbal Medicines. *Herbal Gram* 1993, 28: 13.
- 119 Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990-1997: results of a follow-up national survey. *JAMA.* 1998 Nov 11;280(18):1569-75.
- 120 Veiga- Junior VF, Pinto AC, Maciel MM. Plantas medicinais: cura segura? *Quím. Nova* 2005, 28, 519-528(3).
- 121 Rauh LK, Horinouchi CD, Loddi AM, Pietrovski EF, Neris R, Souza-Fonseca-Guimarães F, Buchi DF, Biavatti MW, Otuki MF, Cabrini DA. Effectiveness of *Vernonia scorpioides* ethanolic extract against skin inflammatory processes. *J Ethnopharmacol.* 2011 Nov 18;138(2):390-7.
- 122 García-Ayuso LE, Sánchez M, Fernández de Alba A, Luque de Castro MD. Focused microwave-assisted soxhlet: an advantageous tool for sample extraction. *AnalChem.* 1998 Jun 1;70(11):2426-31.
- 123 Ong ES, Cheong JS, Goh D. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. *J Chromatogr A.* 2006 Apr 21;1112(1-2):92-102.
- 124 Takeda K, Enoki S, Harborne J, Eagles J. Malonated anthocyanins in malvaceae: Malonylmalvin from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry.* 1989 28: 499 -500.
- 125 Farina A, Doldo A, Cotichini V, Rajevic M, Quaglia MG, Mulinacci N, Vincieri FF. HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva sylvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 1995 Dec;14(1-2):203-11.

- 126 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991 Jun;43(2):109-42.
- 127 Lappin DF, Kjeldsen M, Sander L, Kinane DF. Inducible nitric oxide synthase expression in periodontitis. *J Periodontal Res.* 2000 Dec;35(6):369-73.
- 128 Stashenko P, Fujiyoshi P, Obernesser MS, Probstak L, Haffajee AD, Socransky SS. Levels of interleukin 1 beta in tissue from sites of active periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1991 Aug;18(7):548-54.
- 129 Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol.* 1998 Jan 1;160(1):403-9.
- 130 Lundy FT, Linden GJ. Neuropeptides and neurogenic mechanisms in oral periodontal and periodontal inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jan 1;15(2):82-98.
- 131 Orozco A, Gemmell E, Bickel M, Seymour GJ. Interleukin 18 and periodontal disease. *J Dent Res.* 2007 Jul;86(7):586-93.