

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

ELIANA CRISTINA FOSQUIERA

**DESENVOLVIMENTO DO GEL DE *Malva sylvestris* L. E AVALIAÇÃO CLÍNICA
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA GENGIVAL E NO BIOFILME DENTAL**

PONTA GROSSA

2010

ELIANA CRISTINA FOSQUIERA

**DESENVOLVIMENTO DO GEL DE *Malva sylvestris* L. E AVALIAÇÃO CLÍNICA
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA GENGIVAL E NO BIOFILME DENTAL**

Dissertação apresentada 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. Fábio André dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

PONTA GROSSA

2010

F749d Fosquiera, Eliana Cristina
Desenvolvimento do gel *Malva sylvestris L.* e a avaliação clínica na resposta inflamatória gengival e no biofilme dental / Eliana Cristina Fosquiera. Ponta Grossa, 2010.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Área de Concentração em Clínica Integrada - Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Fábio André dos Santos

Co- Orientador: Prof. Dr. Paulo Vitor Farago

1. Biofilme dental. 2. Inflamação gengival. 3. *Malva sylvestris L.*. I. Santos, Fábio André dos. II. Farago, Paulo Vitor. III. Mestrado em Odontologia. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. T.

CDD: 617.632

ELIANA CRISTINA FOSQUIERA

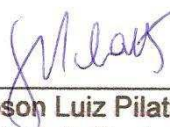
**DESENVOLVIMENTO DO GEL DE *Malva sylvestris* L. E AVALIAÇÃO CLÍNICA
NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA GENGIVAL E NO BIOFILME DENTAL**

Dissertação apresentada para a 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, 25 de fevereiro de 2010.



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago – Co-orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Gibson Luiz Pilatti
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof^ª. Dr^ª. Jane Marifron Budel
UNIBRASIL – Faculdades Integradas do Brasil

*Dedico aos meus pais a quem devo a minha formação e educação,
Ao meu noivo pela compreensão e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus grande mestre, soberano e infinito sem seu refúgio e luz eu nada seria.

Ao meu orientador **Professor Dr. Fábio André dos Santos**, agradeço pela orientação e por todo conhecimento transmitido.

Ao meu co-orientador **Professor Dr. Paulo Vitor Farago**, agradeço pela acolhida no departamento de farmacotécnica para a realização de pesquisas do meu trabalho de dissertação, pelo modo especial que trata seus alunos, por sua paciência em transmitir seu conhecimento de forma clara e com muita boa vontade em todos os momentos. Seu ensino e incentivo nunca serão esquecidos.

À coordenadora do mestrado **Professora Dra. Osnara Mongruel Gomes** por proporcionar oportunidades e condição de trabalho. Agradeço por transmitir força e motivação.

A **todos os professores** do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Odontologia – Mestrado, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e pela grande disposição em colaborar.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, na pessoa do seu reitor **Professor Dr. João Carlos Gomes** e vice-reitor, pela oportunidade e incentivo.

À **Fundação Araucária**, pelo apoio financeiro para a realização desta dissertação de mestrado.

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

A **todos** os colegas do mestrado, obrigada pela aprendizagem e troca de experiências. A construção do conhecimento não é um caminho solitário.

Ao contrário, é um acúmulo de informações, percepções, acertos, aprendizagens, que estão sempre envolvendo diversos personagens.

Aos meus amigos **Alexandra, Daniel, Luiz Alfonso, Miguel, e Yileng**, obrigada pela convivência, pelos momentos de descontração, pelo apoio nos momentos difíceis, pelo companheirismo e amizade.

Às amigas **Juliana e Yasmine**, obrigada por toda ajuda incondicional, pelos bons e maus momentos e pela verdadeira amizade.

À **Márcia Thais Pochapski**, pela disposição em ajudar sempre na realização deste trabalho.

Aos acadêmicos **Letícia, Altair e João Paulo** pela colaboração nas etapas laboratoriais e clínica desta pesquisa.

Aos **funcionários e técnicos da UEPG** pela colaboração nas etapas laboratoriais e clínica da pesquisa e pelo apoio e amizade durante a pós-graduação.

A **todos os voluntários da pesquisa**, pelo auxílio e participação e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse estudo.

Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer é algo que só depende da nossa vontade e perseverança.

Albert Einstein

DADOS CURRICULARES

Eliana Cristina Fosquiera

NASCIMENTO 30.09.1974	Cascavel - PR
FILIAÇÃO	Hitalo Fosquiera Cleonice Lopes Fosquiera
1993 – 1997	Curso de Graduação em Administração de Empresas pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) – Cascavel - PR
2003 – 2006	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Paranaense (UNIPAR)- Cascavel – PR
2007	Curso de Aperfeiçoamento em Prótese Fixa – ABO Regional Cascavel - PR
2008 – 2010	Curso de Pós-graduação em Odontologia Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, nível de Mestrado em Odontologia – Área de Concentração em Clínica Integrada

RESUMO

FOSQUIERA, EC. Desenvolvimento do gel de *Malva sylvestris* L. e avaliação clínica na resposta inflamatória gengival e no biofilme dental. [Dissertação Mestrado em Clínica Integrada – Faculdade de Odontologia] – Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2010.

Os objetivos dessa pesquisa foram realizar a prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico bruto (EHBM) de *Malva sylvestris* L., determinar *in vitro* a atividade antimicrobiana e propriedade antioxidante e *in vivo* a ação antiplaca e antigengivite do EHBM utilizando um modelo de gengivite experimental parcial em humanos. Trinta indivíduos foram selecionados para participar deste estudo cruzado duplo-cego, no qual foram estabelecidos três períodos experimentais de 15 dias cada um com um intervalo de 10 dias entre cada tratamento. Os pacientes foram submetidos a 3 tratamentos: Tratamento 1- Gel placebo, Tratamento 2- Gel de *M. sylvestris* a 10%; Tratamento 3- Gel de clorexidina a 2% (controle positivo). Os parâmetros clínicos avaliados foram o índice de placa, índice de sangramento marginal modificado e o volume de fluido gengival. Os dentes analisados foram: 15, 16, 35 e 36. Os resultados demonstraram a presença de mucilagens (metabólito primário), esteróides e/ou triterpenos, cumarinas, antraquinonas, flavonoides e taninos (metabólitos secundários) no EHBM. A média da atividade antioxidante relativa do EHBM foi igual a 5,75% e do gel de *M. sylvestris* 10% foi 26,30%, em relação a 100% do total de atividade antioxidante atribuída ao ácido ascórbico. Não foi observada a formação de halo de inibição tanto para o método da difusão em disco quanto para a técnica da perfuração no ágar na avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro*. No estudo clínico não se observou diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos para os parâmetros clínicos avaliados e a quantidade de fluido gengival. O metabólito primário e os metabólitos secundários presentes na planta sugerem o seu efeito anti-inflamatório. O EHBM apresentou ausência de atividade antimicrobiana e uma reduzida atividade antioxidante. O gel contendo o extrato hidroalcoólico de *M. sylvestris* 10% não influenciou a formação de biofilme dental supragengival em comparação com o placebo e não influenciou a inflamação gengival em comparação com o placebo e clorexidina.

Palavras-chave: Biofilme dental. Inflamação gengival. *Malva sylvestris*.

ABSTRACT

FOSQUIERA, EC. Development of the *Malva sylvestris* L. gel and clinical evaluation on the gingival inflammatory response and dental plaque. [Dissertação Mestrado em Clínica Integrada – Faculdade de Odontologia] – Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2010.

In this study, a phytochemical screening and the *in vitro* antimicrobial and antioxidant properties of crude hydroalcoholic extract of *Malva sylvestris* L. (EHBM) was performed for a *M. sylvestris* gel formulation. Antiplaque and antigingivitis were also carried out using a partial-mouth, experimental gingivitis model in humans. Thirty subjects were chosen to participate in this crossover double-blind study, three 15-days experimental periods with a 10-days interval between each treatment. Patients were submitted to 3 treatments: Treatment 1 – placebo gel, Treatment 2 – 10% *M. sylvestris* gel; Treatment 3 – 2% chlorhexidine gel (positive control). The clinical parameters plaque index, modified marginal bleeding index and gingival fluid measurement were evaluated. The teeth: 15, 16, 35 and 36 were analyzed. EHBM showed the presence of mucilage (primary metabolite), steroids and/or triterpenes, coumarins, anthraquinones, flavonoids and tannins (secondary metabolites). The antioxidant activity mean was 5.75% and 26.30% compared to 100% of the total antioxidant activity attributed to ascorbic acid, respectively for EHBM and 10% *M. sylvestris* gel. No concentration of EHBM revealed antimicrobial effect in both agar disk and agar well diffusion tests. In the clinical study, there was no statistical difference for clinical parameters and gingival fluid measurement considering the different treatments. The primary and secondary metabolites of *M. sylvestris* suggest its anti-inflammatory effect. The EHBM has a reduced antioxidant activity. No influence on supragingival plaque is observed between 10% *M. sylvestris* gel and placebo. For gingival inflammation, no influence is verified for 10% *M. sylvestris* gel compared to placebo and chlorhexidine.

Keywords: Dental plaque. Gingival inflammation. *Malva sylvestris*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	<i>Malva sylvestris</i> L.....	26
Figura 2-	(A) Droga vegetal estabilizada e rasurada (B), Droga vegetal pulverizada	30
Figura 3-	(A) Maceração dinâmica da droga vegetal pulverizada em álcool 72% (B) Processo de filtração do extrato etanólico de <i>M. sylvestris</i> (C) Concentração do extrato etanólico de <i>M. sylvestris</i> em rotaevaporador (D) Liofilização do extrato concentrado.....	31
Figura 4-	Esquema do fracionamento do EHBM	36
Figura 5-	(1) Homogeneização do microrganismo (2) Suspensão do microrganismo (3) e (4) Suspensão microbiana sendo semeada em placas de ágar Muller-Hinton (5) Confecção dos poços no ágar (6) Adição das substâncias-teste nos poços	39
Figura 6-	(A) Placa de alívio de polivinilacetato com 0,5 mm de espessura confeccionada sobre o modelo de gesso, sendo o alívio para a confecção da moldeira individual (B) Moldeira parcial (15,16 e 35,36) individual de polivinilacetato com 2,0 mm de espessura.....	46
Figura 7-	Desenho experimental do estudo clínico.....	47
Figura 8-	“Kit Individual”: (A) moldeiras individuais acondicionadas em porta moldeiras (B) seringa contendo o gel a ser utilizado (C) e (D) escova dental e dentífrico padronizados.....	48
Figura 9-	Moldeira em posição na boca, envolvendo 2 mm além da margem gengival observando-se o contato do gel com o dente e a gengiva.....	48
Figura 10-	Índice de sangramento marginal à sondagem.....	49
Figura 11-	Coleta do fluído gengival com papel filtro 1 mm abaixo da margem gengival por 30 segundos.....	49
Quadro 1-	Metabólitos secundários investigados na triagem fitoquímica para as folhas de <i>Malva sylvestris</i> L. a partir das frações do EHBM, indicando as respectivas reações de caracterização.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Formulação dos géis empregados na pesquisa.....	40
Tabela 2-	Pesquisa de metabólitos secundários no EHB de <i>Malva sylvestris</i>	50
Tabela 3-	Estudo quantitativo dos metabólitos primário e secundários (média e desvio padrão) para <i>M. sylvestris</i> em estudo a partir da avaliação do EHBM.....	52
Tabela 4-	Atividade antioxidante total (média e desvio padrão) do EHBM e do gel tratamento.....	53
Tabela 5-	Análises físico-químicas de pH (média e desvio padrão) das formulações.....	53
Tabela 6-	Análises de densidade absoluta (média e desvio padrão) das formulações.....	53
Tabela 7-	Análises de consistência (média e desvio padrão) das formulações.....	54
Tabela 8-	Teste Kappa para o índice de placa (Silness e Løe) nas faces vestibular e lingual. Concordância intra-examinador realizado em dois exames com intervalo de 20 minutos.....	55
Tabela 9-	Teste Kappa para o índice de placa (presença e ausência) nas faces proximais. Concordância intra-examinador realizado em dois exames com intervalo de 20 minutos.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx).....	56
Gráfico 2-	Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final na face vestibular para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx).....	57
Gráfico 3-	Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final na face lingual para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx).....	58
Gráfico 4-	Média e erro padrão dos valores dos escores de presença de biofilme interproximal de acordo com o número de sítios.....	58
Gráfico 5-	Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx).....	59
Gráfico 6-	Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final na face vestibular para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx).....	59
Gráfico 7-	Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final na face lingual para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx).....	60
Gráfico 8-	Média e erro padrão dos valores dos escores de presença de sangramento marginal interproximal de acordo com o número de sítios.....	60
Gráfico 9-	Média e erro padrão do volume de fluido gengival (mm ²) absorvido em papel filtro.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	BIOFILME DENTAL.....	17
2.2	DOENÇA PERIODONTAL.....	18
2.2.1	Gengivite induzida por biofilme bacteriano.....	18
2.2.2	Resposta imuno-inflamatória do hospedeiro ao biofilme bacteriano.....	19
2.3	TRATAMENTO DA GENGIVITE INDUZIDA POR BIOFILME BACTERIANO.....	20
2.3.1	Fitoterapia.....	20
2.3.2	O uso de fitoterápicos na odontologia.....	22
2.4	CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE VEGETAL <i>Malva sylvestris</i> L.....	23
2.4.1	Características gerais e histórico de <i>M. sylvestris</i>	23
2.4.2	Composição química de <i>M. sylvestris</i>	23
2.4.3	Ações farmacológicas de <i>M. sylvestris</i>	24
2.4.4	Uso etnomedicinal de <i>M. sylvestris</i>	24
3	PROPOSIÇÃO.....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAL E MÉTODO.....	28
4.1	DROGA VEGETAL.....	28
4.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE <i>M. sylvestris</i> (EHBM).....	28
4.2.1	Padronização da droga vegetal.....	28
4.2.1.1	Determinação do teor de umidade da droga vegetal.....	28
4.2.2	Elaboração do extrato hidroalcoólico bruto de <i>M. sylvestris</i> (EHBM)...	29
4.3	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	32
4.3.1	Marcha Sistemática Fitoquímica.....	32
4.3.1.1	Fracionamento do EBHM.....	32
4.3.1.2	Ensaio Fitoquímico Qualitativo.....	32
4.3.1.3	Ensaio Fitoquímico Quantitativo.....	33
4.3.1.3.1	Determinação quantitativa de mucilagens.....	34
4.3.1.3.2	Determinação quantitativa de fenólicos totais.....	34
4.3.1.3.3	Determinação quantitativa de cumarinas.....	35
4.4	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS PARA <i>Malva sylvestris</i> L.....	37
4.4.1	Atividade antioxidante total.....	37
4.4.2	Atividade antimicrobiana.....	37
4.4.2.1	Técnica da perfuração no ágar.....	38
4.4.2.2	Técnica da difusão em disco.....	38
4.5	DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS.....	40
4.5.1	Estudos de pré-formulação.....	40
4.5.2	Controle da qualidade das formas farmacêuticas.....	41
4.5.2.1	Determinação dos valores de pH.....	41
4.5.2.2	Determinação da densidade absoluta.....	41

4.5.2.3	Determinação da consistência.....	41
4.5.2.4	Avaliação microbiológica.....	41
4.6	ESTUDO CLÍNICO.....	42
4.6.1	Seleção da amostra.....	42
4.6.2	Procedimentos clínicos – fase preliminar.....	42
4.6.3	Parâmetros clínicos avaliados.....	43
4.6.3.1	Índice de placa.....	43
4.6.3.2	Índice de sangramento marginal.....	44
4.6.4	Avaliação do volume do fluido gengival.....	44
4.6.5	Calibração do examinador.....	45
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS	50
5.1	ESTUDO FITOQUÍMICO.....	50
5.1.1	Marcha sistemática fitoquímica.....	50
5.1.1.1	Ensaio fitoquímico qualitativo.....	50
5.1.1.2	Ensaio fitoquímico quantitativo.....	51
5.2	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	52
5.2.1	Atividade antioxidante total.....	52
5.2.2	Atividade antimicrobiana.....	52
5.3	DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS.....	53
5.3.1	Controle da qualidade das formas farmacêuticas.....	53
5.3.1.1	Determinação dos valores de pH.....	53
5.3.1.2	Determinação da densidade absoluta.....	53
5.3.1.3	Determinação da consistência.....	54
5.3.1.4	Avaliação microbiológica.....	54
5.4	ESTUDO CLÍNICO.....	54
5.4.1	Análise dos parâmetros clínicos.....	55
5.4.1.1	Concordância intra-examinador.....	55
5.4.1.2	Índice de placa.....	56
5.4.1.3	Índice de sangramento marginal.....	58
5.4.2	Avaliação do volume do fluido gengival.....	61
6	DISCUSSÃO.....	62
7	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	70
	APÊNDICE A – Modelo de ficha clínica e coleta de dados.....	79
	APÊNDICE B – Planilhas com os dados descritivos da análise estatística.....	82
	ANEXO A – Parecer de aprovação COEP.....	87

1 INTRODUÇÃO

O controle do biofilme dental é de grande importância para a manutenção da saúde bucal dentro das diversas especialidades da Odontologia. O biofilme é formado por uma comunidade de microrganismos complexa que se desenvolve nas superfícies dentárias, próteses, restaurações e implantes. Quando não controlado, pode promover doenças como a cárie, gengivite e periodontite (Baheni, Takeuchi¹ 2003, Axelson et al.² 2004, Tatakis, Trombelli³ 2004).

O uso da escova/dentífrício e fio dental na higienização bucal é considerado um método mecânico convencional eficiente no controle do biofilme dental. No entanto, em muitas situações, indivíduos com limitações físicas ou mentais, idosos e pacientes hospitalizados, podem apresentar dificuldade em realizar uma adequada limpeza dos dentes somente com os métodos mecânicos convencionais (Axelson et al.² 2004). A busca de outras possibilidades terapêuticas, entre elas, o uso coadjuvante de substâncias químicas, como os enxaguatórios bucais, tem sido utilizada com o objetivo de complementar a higiene bucal (Ciancio⁴ 2003).

A incorporação de substâncias, como extratos de plantas medicinais, nos dentífrícios e/ou nos enxaguatórios bucais que auxiliem no controle do biofilme dental e que atuem no processo inflamatório, pode ser uma alternativa como complemento à higienização convencional (Davies⁵ 2008).

A medicina tradicional representa a soma de conhecimentos, sabedoria e práticas baseada em histórias, crenças e experiências de diferentes culturas, usadas não só na manutenção da saúde, como também na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças. Nesse contexto, as plantas são mundialmente empregadas na medicina tradicional. A Organização Mundial da Saúde (WHO⁶ 2002) menciona que até 80% da população africana utiliza a medicina tradicional. Na China, representa cerca de 40 % de todos os cuidados de saúde. A medicina tradicional também está se tornando cada vez mais popular em países desenvolvidos, como Austrália (48%), Bélgica (38%), Canadá (70%), Estados Unidos (42%) e França (75%).

Entretanto, apesar do uso frequente das plantas medicinais pela população, até hoje são insuficientes os estudos sobre a composição química, as atividades biológicas e os mecanismos de ação de espécies fitoterápicas (Medeiros

et al.⁷ 2004).

Malva sylvestris L. é uma espécie herbácea, pertencente à família Malvaceae Juss, nativa da Europa e cultivada no Sul do Brasil. É empregada desde a Idade Média para o tratamento de queimaduras, picadas de inseto e infecções das vias urinárias e intestinais. É amplamente utilizada pela população como agente antiinflamatório e cicatrizante (Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008). Contudo, ainda faltam estudos clínicos científicos que confirmem a viabilidade do uso dessa espécie nas afecções odontológicas. Neste contexto, considera-se importante o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa na Odontologia, no sentido de compreender os mecanismos de ação e efeitos adversos da utilização dessa planta medicinal no biofilme dental e no tratamento da inflamação gengival.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Com a finalidade de facilitar a leitura e entendimento, a revisão de literatura foi dividida considerando os aspectos relacionados ao biofilme dental à doença periodontal e tratamento da gengivite.

2.1 BIOFILME DENTAL

O biofilme consiste em uma massa bacteriana que pode ser definida como uma comunidade complexa de microrganismos que formam um ecossistema estruturado, altamente dinâmico, que atua de maneira coordenada e integrada. Sintetizam matriz de polissacarídeos e glicoproteínas que envolvem a comunidade microbiana, protegendo-a contra os efeitos danosos do ambiente bucal circundante. Esta estrutura organizada permite uma inter-relação sinérgica entre os microrganismos para prover nutrientes uns aos outros, além de fornecer barreiras químicas e físicas que podem impedir as defesas imunológicas do hospedeiro ou a ação de agentes antimicrobianos (Haffajee, Socransky⁹ 2005).

Gengivas saudáveis têm sido associadas a uma composição do biofilme dental supragengival de poucas camadas (1-20) predominantemente cocos gram-positivos (*Streptococcus* spp.: *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. oralis*; *Rothia dentocariosa*; *Staphylococcus epidermidis*), seguido por alguns gram-positivos filamentosos (*Actinomyces* spp.: *A. viscosus*, *A. israelitas*, *A. gerencseriae*; *Corynebacterium* spp.) e poucos cocos gram-negativos (*Veillonella parvula*; *Neisseria* spp.). O crescente acúmulo destes microrganismos permite a posterior adesão de outras espécies microbianas, que são capazes de prenderem-se as já existentes (co-agregação). Esta é a chamada "colonização secundária". Alterações no ecossistema do biofilme dental microbiano possibilitam a colonização de bactérias gram-negativas. Com o aumento do número de camadas do biofilme dental, o ambiente nutricional e atmosférico se altera, diminui o nível de oxigênio, proporcionando a sobrevivência de bactérias anaeróbias (Bernimoulin¹⁰ 2003, Haffajee, Socransky⁹ 2005).

2.2 DOENÇA PERIODONTAL

Doença periodontal refere-se a qualquer alteração que afeta as estruturas de proteção e suporte do dente. É uma condição inflamatória que compreende as diversas formas de gengivite e periodontite, em que a progressão do processo inflamatório pode levar a perda do dente. As doenças do periodonto podem ser classificadas em gengivites, periodontites, doenças periodontais necrosantes, abscessos periodontais, periodontite associada a lesões endodônticas, deformidades e condições adquiridas ou do desenvolvimento (Armitage¹¹ 1999, Kinane¹² 2001).

2.2.1 Gengivite induzida por biofilme bacteriano

A gengivite induzida por biofilme bacteriano é a forma mais prevalente de doença periodontal, podendo esta ser modificada por fatores sistêmicos. A reação inflamatória que ocorre em resposta à presença das bactérias do biofilme manifesta-se como uma alteração da integridade dos tecidos gengivais. Entretanto, na presença de uma higiene bucal efetiva, a inflamação gengival se torna reversível. Saúde gengival pode ser considerada um estado de equilíbrio em que os microrganismos presentes no ambiente bucal estão controlados, não resultando em danos para os tecidos periodontais do hospedeiro (Armitage¹¹ 1999).

A instalação da gengivite está associada com o desenvolvimento de uma forma mais organizada do biofilme. Este biofilme é caracterizado por várias camadas de células (100-300), organizadas pelo metabolismo e condições atmosféricas. Além de cocos gram-positivos, bastonetes e filamentos associados com gengivas saudáveis, aumentam o número de cocos gram-negativos, bastonetes e filamentos e surgem as bactérias anaeróbias (*F. nucleatum*, *C. rectus*, *B. gracilis*, *P. loeschii*, *Capnocytophaga* spp., entre outras). As espécies envolvidas variam conforme as características ambientais locais, mas o padrão de colonização é sempre o mesmo (Bernimoulin¹⁰ 2003, Haffajee, Socransky⁹ 2005).

Estudos clínicos têm demonstrado que os microrganismos colonizam rapidamente as superfícies dentais e em indivíduos que negligenciam os procedimentos de higiene bucal, dentro de 10 a 21 dias, os sinais clínicos de gengivite se tornam aparentes (Kinane¹² 2001).

2.2.2 Resposta imuno-inflamatória do hospedeiro ao biofilme bacteriano

As alterações teciduais e imuno-inflamatórias observadas na gengivite induzida por biofilme bacteriano incluem dilatação dos vasos e aumento da permeabilidade vascular, aumento do fluxo do fluido gengival (FG) e migração de neutrófilos polimorfonucleares (PMN). Os PMNs são identificados no FG e possuem mecanismos antimicrobianos altamente especializados que quando ativados, produzem mediadores quimiotáticos e vasoativos que perpetuam a resposta inflamatória do hospedeiro. O aumento do nível de PMN no FG ativa interleucina-8, sendo uma das primeiras mudanças associadas com a transição da saúde para doença (Kinane¹² 2001, Preshaw¹³ 2008).

O FG é um exsudato/infiltrado inflamatório presente no sulco gengival ou bolsa periodontal. No início do processo da doença, enquanto o periodonto é clinicamente saudável, os colonizadores iniciais estão confinados a margem gengival, o fluxo do FG neste estágio é relativamente baixo, sendo composto principalmente de um transudato de proteínas plasmáticas. Resultados de estudos mostraram a presença de uma alta quantidade de mediadores inflamatórios nos sítios com gengivite em comparação com sítios saudáveis em indivíduos normais (Goodson¹⁴ 2003).

A composição do FG em sítios com gengivite é o resultado da interação entre as bactérias subgengivais e as células dos tecidos periodontais. É composto por derivados do plasma, bactérias do biofilme, células epiteliais descamadas, leucócitos PMNs, mediadores inflamatórios e enzimas. Estas substâncias são potenciais indicadores de atividade da doença periodontal, observando-se sua redução quando do restabelecimento da saúde após o tratamento. A composição do FG reflete a natureza e amplitude da resposta do hospedeiro. A determinação dos níveis dos elementos do FG representa uma boa abordagem para a avaliação do risco para a doença (Goodson¹⁴ 2003, Kantarci et al.¹⁵ 2006).

Inúmeros estudos têm analisado a associação entre a quantidade total ou níveis de concentração dos diferentes componentes do FG e a condição periodontal. A coleta do FG é um procedimento minimamente invasivo, sendo que a análise de seus componentes pode contribuir para o estabelecimento do diagnóstico periodontal (Delima, Van Dyke¹⁶ 2003, Kantarci et al.¹⁵ 2006).

2.3 TRATAMENTO DA GENGIVITE INDUZIDA POR BIOFILME BACTERIANO

O papel etiológico do biofilme para o desenvolvimento de gengivite é ainda apoiado por vários estudos de intervenção, em que a redução ou eliminação do biofilme dental por meios mecânicos ou agentes químicos antimicrobianos, promoveram a resolução da doença. Assim, o controle do biofilme é um “fator chave” para prevenir e controlar a gengivite (Kinane¹² 2001, Axelson et al.² 2004, Tatakis, Trombelli³ 2004, Van der Weijden, Hioe¹⁷ 2005).

O biofilme supragengival está exposto à saliva e aos mecanismos naturais de auto-limpeza existentes na cavidade bucal. No entanto, embora tais mecanismos possam eliminar restos alimentares, não são suficientes para desestruturar o biofilme bacteriano, sendo a higiene bucal regular um pré-requisito para a manutenção de uma boa condição de saúde bucal (Van der Weijden, Hioe¹⁷ 2005).

A higienização bucal por meio de escova/dentífrício e fio dental, na maioria dos casos é suficiente para controlar o biofilme dental, porém em algumas situações não se consegue atingir todos os objetivos somente com o controle mecânico, pois o mesmo requer tempo, motivação e destreza manual. Mesmo pacientes que são treinados e instruídos para manterem sua higiene satisfatória, na ausência de constantes reforços sobre educação em saúde, os níveis de cooperação diminuem significativamente com o tempo (Ciancio⁴ 2003, Axelson et al.² 2004, Albert-Kiszely et al.¹⁸ 2007). Indivíduos com limitações físicas ou mentais, idosos, pacientes com dentes mal posicionados e/ou portadores de aparelhos ortodônticos fixos podem apresentar dificuldades quanto à escovação dentária e uso do fio dental (Ciancio⁴ 2003, Axelson et al.² 2004).

Anti-sépticos são agentes químicos que podem eliminar microrganismos, como bactérias, vírus e fungos ou interferir com sua reprodução ou metabolismo. Para que um agente anti-placa seja efetivo é necessário que tenha um amplo espectro de atividade antimicrobiana; substantividade às superfícies bucais; gosto agradável; apresentar baixa toxicidade e mínima influência na microbiota residente. Além disso, alguns agentes químicos possuem também propriedades anti-inflamatórias (Ciancio⁴ 2003).

Bochechos com anti-sépticos têm sido amplamente utilizados em Odontologia como auxiliares no controle do biofilme bacteriano e gengivite. É evidente que se um paciente melhora o controle do biofilme e consequentemente sua condição gengival, o uso de quimioterápicos como coadjuvantes pode não mais ser necessário (Ciancio⁴ 2003, Albert-Kiszely et al.¹⁸ 2007, Moran¹⁹ 2008).

Diversas substâncias têm sido utilizadas para o controle químico do biofilme dental, como óleos essenciais, triclosan, clorexidina, cloreto de cetilpiridínio, fluoreto estanoso, sais de zinco e alcalóides de plantas de várias espécies. Entretanto, ainda hoje, a clorexidina é considerada o padrão de referência dos agentes para o controle químico do biofilme dental (Albert-Kiszely et al.¹⁸ 2007, Herrera et al.²⁰ 2007).

A maioria dos agentes químicos utilizados para o controle do biofilme dental não produz grandes alterações no tipo ou quantidade da microbiota bucal. Do mesmo modo, não são observados efeitos toxicológicos consideráveis nas concentrações utilizadas. No entanto, a clorexidina, o fluoreto estanoso e o cloreto de cetilpiridínio podem ocasionar coloração/manchamento dos dentes e das mucosas, descamação epitelial, além de alteração de paladar (Moran¹⁹ 2008).

Devido às questões mencionadas acima, pesquisas buscam compostos terapêuticos similares a esses produtos, mas que tenham menos efeitos colaterais. Assim, verifica-se um grande avanço científico nos estudos com plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (Cechinel Filho, Yunes²¹ 1998).

2.3.1 Fitoterapia

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define os fitoterápicos como medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera e suco). Um fitoterápico é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (Carvalho et al.²² 2008). Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações dessas com extratos vegetais (ANVISA²³ 2004).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55 mil espécies catalogadas. As plantas são importantes fontes de produtos biologicamente ativos, muitos dos quais são os compostos químicos para a semi-síntese de um grande número de fármacos. Apesar do aumento do número de investigações nessa área, os dados disponíveis indicam que apenas 15% a 17% das plantas brasileiras foram avaliadas quanto ao seu potencial medicinal. A Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), estima que cerca de 82% da população brasileira utiliza produtos a base de plantas medicinais (Medeiros et al.⁷ 2004, Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008, Carvalho et al.²² 2008, ABIFISA²⁴ 2009).

Contudo, o uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e, principalmente, toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Isso acontece com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população. A determinação botânica correta da planta, sua forma de uso, posologia e controle da qualidade também constituem questões a serem estudadas (Billeter et al.²⁵ 1990, Redzic et al.²⁶ 2005).

2.3.2 O uso de fitoterápicos na Odontologia

Os medicamentos fitoterápicos são muito utilizados nos cuidados gerais de saúde, sendo que muitas propriedades das espécies de valor na medicina podem ser transferidas para a Odontologia, indicadas principalmente para o uso em processos inflamatórios, dor e na cicatrização. Os meios mais comuns de preparo são a decocção, a maceração e a infusão (Lima Júnior et al.²⁷ 2005).

Na clínica odontológica, os pacientes relatam utilizar bochechos de plantas medicinais na forma de infusão no pós-cirúrgico, com o objetivo de minimizar o edema. A infusão obtida de sálvia (*Salvia officinalis* L.) apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana. *Calendula officinalis* L. é empregada na cicatrização de feridas, com ação anti-inflamatória e antibacteriana (Oliveira et al.²⁸ 2007).

Inúmeros estudos avaliaram in vitro e in vivo a atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante, antiviral, antifúngica, anestésica e antioxidante, a partir de diversos extratos e óleos vegetais como: aroeira, romã, tanchagem, óleo de copaíba, jambolão, sálvia, arnica, calêndula, hamamelis, anis-estrelado, melissa, ficus, algodoeiro-arbóreo, alecrim, capim-limão e acácia-mimosa,

confirmando as propriedades das mesmas (lauk et al.²⁹ 2003, Drumond et al.³⁰ 2004, Pereira et al.³¹ 2005, Soares et al.³² 2006, Silva et al.³³ 2006, Soares et al.³⁴ 2007, Zanin et al.³⁵ 2007).

Malva sylvestris L. (malva) apresenta propriedades anti-inflamatórias em função da presença de substâncias, como as mucilagens e as antocianinas. As antocianinas também possuem ação anti-séptica. Bochechos feitos a partir da infusão das folhas de malva têm sido utilizados para o tratamento de feridas e de lesões na mucosa bucal (Billeter et al.²⁵ 1990, Lima Junior, Dimenstein³⁶ 2006).

2.4 CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE VEGETAL - *Malva sylvestris* L.

2.4.1 Características gerais e histórico de *M. sylvestris*

A *Malva sylvestris* L. (Figura 1) é uma espécie herbácea, pertencente à família Malvaceae Juss, nativa da Europa e cultivada no sul do Brasil (Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008). Cresce de forma espontânea em quase toda a Europa, norte da Ásia e África (Hiçsonmez et al.³⁷ 2009). Popularmente conhecida como malva, malva-comum, malva-grande, malva-rosa, malva-verde, rosa-chinesa e rosa-marinha. A espécie apresenta 40–70 cm de altura, caule com casca fibrosa, piloso e ramificado, folhas simples, com 7–15 cm de comprimento, nervação palmada, revestidas de tricomas ásperos. As flores alcançam um tamanho de 2–4 cm de diâmetro, coloração púrpura ou vários tons de róseo, sendo que a floração ocorre entre a primavera e o verão (Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008).

A malva encontra-se registrada na ANVISA como medicamento fitoterápico, na categoria de demulcentes de uso oral para o tratamento de inflamação na orofaringe (Carvalho et al.²² 2008).

2.4.2 Composição química de *M. sylvestris*

É uma espécie mucilagínosa, contendo entre 8% e 20% de mucilagem nas folhas e nas flores. Também foram identificados nas folhas e flores, a presença de taninos, vitaminas A, B1, B2, C, carotenos, flavonóides, antocianidinas, leucoantocianidinas, ácidos *p*-cumarínico, clorogênico e cafeico, derivados antraquinônicos, ácido palmítico e ácido esteárico. A composição química

da planta pode ter implicações importantes para a saúde. Embora alguns elementos sejam benéficos, outros podem ser tóxicos. A concentração dos elementos químicos da malva está entre os limites de segurança permitidos internacionalmente (Farina et al.³⁸ 1995, Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008, Hiçsonmez et al.³⁷ 2009).

2.4.3 Ações farmacológicas de *M. sylvestris*

As mucilagens presentes nas folhas e nas flores da malva apresentam uma ação anti-inflamatória e protetora das mucosas do aparelho digestivo e respiratório, além da superfície cutânea (Farina et al.³⁸ 1995, Alonso³⁹ 1998, Cutillo et al.⁴⁰ 2006, Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008). Os derivados antraquinônicos conferem um leve efeito laxante, no entanto, as mucilagens, podem atuar como antidiarréicos, devido a sua natureza coloidal, impedindo a ação de substâncias irritantes. Os extratos etanólicos da malva apresentam uma ação estimulante da atividade fagocitária do sistema retículo endotelial (Alonso³⁹ 1998).

Chiclana et al.⁴¹ (2009), avaliaram a atividade anti-inflamatória local de *M. sylvestris* L. em modelo experimental de edema de pata em ratas induzido por carragenina. Os animais foram divididos em cinco grupos, sendo o grupo controle aplicado gel placebo, grupo controle positivo a indometacina a 2% e grupos tratados com o gel de malva a 5%, 10% e 20%. Os resultados demonstraram que o gel contendo o extrato de malva a 5% reduziu significativamente o edema induzido por carragenina, mostrando o maior poder antiinflamatório, com redução significativa do edema após 3 horas.

No estudo de Conforti et al.⁴² 2008, analisou-se a atividade anti-inflamatória de *M. sylvestris* L. por meio do experimento de edema de orelha em camundongos induzido pelo óleo de cróton. Verificou-se diferenças estatísticas significativas entre o grupo controle e o grupo extrato hidroalcoólico de malva na dose de 300µg/cm² que reduziu o edema em 21%.

2.4.4 Uso etnomedicinal de *M. sylvestris*

A malva é citada na literatura etnofarmacológica como espécie medicinal capaz de suavizar a irritação dos tecidos e reduzir inflamações. Suas folhas, flores e frutos são empregados na forma de infusão, no tratamento de tosse,

asma, enfisema pulmonar, coqueluche, inflamação da mucosa bucal e faríngea. Em dose excessiva é considerada laxativa (Farina et al.³⁸ 1995, Drumond et al.³⁰ 2004, Cutillo et al.⁴⁰ 2006, Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008, Hiçsonmez et al.³⁷ 2009).

Na Europa, a decocção da malva com leite é utilizada para o tratamento de úlceras de estômago. No Líbano a malva é utilizada para lavar ferimentos e tecidos inflamados, ou mesmo, como gargarejo em inflamações da garganta. Na Argentina é usada no tratamento da constipação intestinal. Na região sul do Brasil, as folhas, flores, raízes e sementes são empregadas para combater febre, para lavagem de ferimentos, para tratar dores de bexiga e tratamento de processos inflamatórios (Alonso³⁹ 1998, Souza et al.⁴³ 2004, Hiçsonmez et al.³⁷ 2009, Jeambey et al.⁴⁴ 2009).

Devido à elevada utilização da malva como agente anti-inflamatório e o reduzido número de estudos clínicos que confirmem a viabilidade do uso dessa espécie nas afecções odontológicas, considera-se importante o desenvolvimento de trabalhos de pesquisa na Odontologia, no sentido de compreender os mecanismos de ação e efeitos adversos da utilização dessa planta medicinal no biofilme dental e no tratamento da inflamação gengival.



Figura 1: *Malva sylvestris* L. ⁴⁵

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve por objetivo desenvolver o gel de *Malva sylvestris* L. e avaliar clinicamente o seu efeito sobre o biofilme dental e a inflamação gengival.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar o extrato hidroalcoólico bruto de *M. sylvestris*;
- Realizar a prospecção fitoquímica do extrato hidroalcoólico bruto de *M. sylvestris*;
- Determinar a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico bruto de *M. sylvestris*;
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico bruto de *M. sylvestris*;
- Obter o gel contendo o extrato hidroalcoólico bruto de *M. sylvestris*;
- Verificar a influência da aplicação tópica do gel contendo o extrato hidroalcoólico bruto de *M. sylvestris* sobre o acúmulo do biofilme dental e a inflamação gengival em humanos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 DROGA VEGETAL

A espécie vegetal *Malva sylvestris* L. foi adquirida da empresa Quimer Ervas e Especiarias (São Paulo – Brasil), estabilizada e rasurada. Dados gerais disponíveis no certificado de análises do fornecedor: insumo – malva padrão importada; parte utilizada – folhas e caules; lote 001; colheita em 01/2008; origem/procedência: sul do Brasil; validade – 01/2013. O vegetal foi armazenado em sua embalagem original, sempre fechada, em local seco, arejado, longe do calor e da umidade, considerando a necessidade de preservar as suas características físico-químicas e microbiológicas.

4.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO BRUTO DE *M. sylvestris* (EHBM)

4.2.1 Padronização da droga vegetal

A planta estabilizada e rasurada (Figura 2A) foi submetida ao processo de cominuição por meio de um triturador em hélice de uso doméstico. Após a trituração, as partículas foram submetidas à tamisação através do Tamis ABNT 35 (500 μm) para se obter uma granulometria correspondente à classificação de pó moderadamente grosso (Figura 2B) (Farmacopéia ⁴⁶ 2000).

4.2.1.1 Determinação do teor de umidade da planta

Previamente ao processo de extração dos princípios ativos contidos na droga vegetal, foi realizada a determinação do teor de umidade do material pulverizado e tamisado, com o objetivo de corrigir a concentração do líquido extrator a ser utilizado na etapa de maceração dinâmica (WHO⁴⁷ 1998).

O método escolhido para a verificação da umidade residual do pó foi o ensaio gravimétrico de perda por dessecação. Para a realização desse procedimento, foram pesadas 4 g das partículas pulverizadas em placas de Petri, em triplicata. Após a pesagem, as placas foram submetidas ao aquecimento em

estufa a 105 °C durante três dias ou até massa constante. O material foi retirado da estufa e transferido ao dessecador contendo sílica gel para a redução da temperatura. Em seguida, as placas foram novamente pesadas. A perda por dessecação foi obtida a partir da diferença entre o peso inicial (massa total úmida) e o peso final (massa total seca), obtendo-se uma umidade média de 9,08%.

4.2.2 Elaboração do extrato hidroalcoólico bruto de *M. sylvestris* (EHBM)

O extrato vegetal foi preparado por meio do método de maceração dinâmica. Para isso, uma massa de 50 g da droga vegetal devidamente pulverizada e tamisada foi adicionada em 220 mL de etanol 72 °GL, considerando a umidade residual contida no pó de malva. O material foi conduzido à maceração dinâmica em mesa agitadora orbital MA140/CF (Marconi®, Piracicaba – Brasil) à temperatura ambiente, durante sete dias (Figura 3A). Transcorrido esse período, o material sólido foi retido em peneira doméstica e o volume foi completado para 250 mL, com mais etanol 72 °GL. O meio líquido foi filtrado em funil de vidro com papel filtro qualitativo (80 g m⁻², porosidade de 3 µm) por duas vezes (Figura 3B).

Considerando a necessidade de maximizar a concentração de princípios ativos, o extrato foi submetido ao processo de redução do volume em evaporador rotativo (modelo E344 B2, Quimis®, Diadema, Brasil) à temperatura de 55°C e 58 rotações por minuto (Figura 3C). O extrato concentrado foi levado ao congelador a – 80 °C.

O extrato congelado foi então submetido ao processo de liofilização (Liofilizador L20 , LIOTOP®, São Carlos, Brasil) (Figura 3D). O objetivo da liofilização foi o reduzir o volume de etanol e de água do material, para preservar as substâncias ativas da malva. O extrato liofilizado foi armazenado em temperatura ambiente.



Figura 2 - (A) Droga vegetal estabilizada e rasurada (B) Droga vegetal pulverizada.



Figura 3 - (A) Maceração dinâmica da droga vegetal pulverizada em álcool 72%. (B) Processo de filtração do extrato etanólico de *M. sylvestris* (C) Concentração do extrato etanólico de *M. sylvestris* em rotaevaporador (D) Liofilização do extrato concentrado.

4.3 ESTUDO FITOQUÍMICO

4.3.1 Marcha Sistemática Fitoquímica

4.3.1.1 Fracionamento do EHBM

A marcha fitoquímica foi realizada a partir do fracionamento do extrato bruto previamente obtido. Este processo possibilita reações mais fidedignas, sendo que o uso do extrato bruto pode, eventualmente, mascarar o resultado (Falkenberg et al.⁴⁸ 2004).

Primeiramente, 200 mL do extrato hidroalcoólico bruto foi concentrado em evaporador rotativo. Em seguida, foram realizadas quatro partições líquido-líquido em série crescente de polaridade (Figura 4), iniciando-se com o *n*-hexano P.A. (F1). Para a fração FHEX, foram feitas cinco extrações com esse mesmo solvente, utilizando 40 mL de hexano de cada vez, totalizando 200 mL da fração F1. O hexano foi acrescentado em funil de separação, em seguida o extrato foi concentrado. Após a agitação vigorosa, o funil de separação foi mantido em repouso, para a formação de duas fases distintas, sendo que a fase hexânica foi recolhida em frasco e armazenada. O extrato residual foi levado ao banho-maria (60 °C) para a remoção total do hexano.

O segundo fracionamento foi conduzido com clorofórmio P.A. (F2, FCLOR) e o terceiro, com acetato de etila P.A. (F3, FETAC), sendo adotado o mesmo procedimento descrito anteriormente. A última fração foi obtida a partir de etanol 70 % (V/V) (F4). Nessa etapa final, após a remoção do solvente acetato de etila, foi acrescentado o etanol 70 % ao extrato remanescente, até completar o volume de 200 mL, originando a fração FHAR, sem a utilização do funil de separação. As frações F1, F2, F3 e F4 foram acondicionadas e armazenadas para a realização dos ensaios fitoquímicos.

4.3.1.2 Ensaios Fitoquímicos Qualitativos

O screening fitoquímico foi desenvolvido para as quatro frações provenientes do EHBM, conforme sumarizado no quadro 1. Os grupos de metabólitos secundários foram avaliados por meio de reações específicas para

triterpenos/esteróides, alcalóides, antraquinonas, cumarinas, flavonóides, saponinas e taninos (Simões et al.⁴⁹ 2004). A intensidade de cor e/ou o aparecimento de precipitado após a realização das reações foram interpretadas como respostas (positivas/negativas).

Metabólito secundário	Ensaio(s)	Referência(s)
Triterpenos/esteróides	Reação de Liebermann-Burchard	Farnsworth ⁵⁰ 1966
Alcalóides	Reação de Bertrand Reação de Bouchardat Reação de Dragendorff Reação de Mayer	Evans ⁵¹ 1989
Antraquinonas	Reação de Bornträger	Evans ⁵¹ 1989
Cumarinas	Método de UV utilizando ninhidrina	Harborne ⁵² 1998
Glicosídeos flavônicos	Reação de Shinoda Reação oxalo-bórica Reação de Pacheco Reação com zinco	Farnsworth ⁵⁰ 1966
Glicosídeos saponínicos	Teste de formação de espuma	Simões et al. ⁴⁹ 2004
Taninos	Reação com Cloreto Férrico 1% Reação com gelatina a 2,5 % Reação sulfato de ferro amoniacal 5% Reação com ácido nitroso	Simões et al. ⁴⁹ 2004, Harborne ⁵² 1998

Quadro 1 - Metabólitos secundários investigados na triagem fitoquímica para as folhas de *Malva sylvestris* L. a partir das frações do EHBM, indicando as respectivas reações de caracterização.

4.3.1.3 Ensaios Fitoquímicos Quantitativos

A partir dos metabólitos descritos para *M. sylvestris* (Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008) e com as informações obtidas a partir dos ensaios fitoquímicos (item 4.3.1.2), o estudo quantitativo do EHBM foi conduzido para as mucilagens (metabólito primário), para os compostos fenólicos (flavonóides e taninos) e para as cumarinas (metabólitos secundários) (Simões et al.⁴⁹ 2004).

4.3.1.3.1 Determinação quantitativa de mucilagens

O método de extração das mucilagens (Judice⁵³ 1991) foi constituído de quatro etapas: 1ª etapa: O EHBM (10 mL) foi centrifugado (4000 g^{-1} por 10 min), sendo o sobrenadante descartado e o material precipitado lavado com água destilada e centrifugado nas mesmas condições. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes. 2ª etapa: Ao material precipitado adicionou-se dois volumes de NaOH. A mistura foi mantida em agitação lenta, por 2 h, em seguida centrifugada (4000 g^{-1} por 15 min), o sobrenadante foi levado para próxima etapa. 3ª etapa: Ao sobrenadante, adicionou-se dois volumes de etanol, sendo mantido a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24 h. 4ª etapa: As mucilagens da fase líquida foram separadas após centrifugação (4000 g^{-1} por 15 min), sendo o sobrenadante e o precipitado lavado com etanol 75% (v/v). Em seguida nova centrifugação foi feita (4000 g^{-1} por 10 min), descartando-se o sobrenadante. A quantificação das mucilagens foi realizada em triplicata, segundo o método colorimétrico descrito por Strickland e Parsons⁵⁴ (1972).

Após a extração, as mucilagens foram dispersas em 50 mL de água destilada e conduzidas a filtração. Uma alíquota de 10 mL do filtrado foi adicionada de 2 mL de uma solução de fenol a $0,52\text{ mol.L}^{-1}$. Em seguida, o recipiente foi coberto com papel alumínio e, então, adicionou-se 10 mL de ácido sulfúrico concentrado contendo 0,1% de hidrazina, sendo mantido à temperatura ambiente por 1 h. A absorvância foi medida em 490 nm, frente ao branco de água destilada. Como padrão, foi utilizada uma solução de D-glucose na concentração de $10\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. O teor de mucilagem resultante foi expresso em porcentagem.

4.3.1.3.2 Determinação quantitativa de fenólicos totais

Para a extração dos compostos fenólicos totais, 5 g das folhas e caules de malva pulverizada foi misturada com 80 mL de metanol P.A., sendo mantido em agitação (overnight). A suspensão foi filtrada e diluída para 100 mL de metanol. O ensaio foi efetuado em triplicata, sendo que as amostras foram mantidas a 4°C . O conteúdo total de fenólicos foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Rumbaoa et al.⁵⁵ 2009), em triplicata. A absorvância foi obtida em 740 nm, depois de 2h em ausência de luz na temperatura ambiente, frente ao branco de metanol P.A.

4.3.1.3.3 Determinação quantitativa de cumarinas

Para a determinação de cumarinas foi utilizado o método descrito por Osório e Martins⁵⁶ (2004). Resumidamente, 4 mL de EHBM foram transferidos para um balão volumétrico de 200 mL, sendo adicionados 40 mL de água destilada e 10 mL de uma solução de acetato de chumbo a 5%. O balão volumétrico foi agitado, desprezando os primeiros 10 mL, transferindo-se uma alíquota de 40 mL do filtrado para um balão volumétrico de 200 mL. O volume foi completado com uma solução de ácido clorídrico a 0,1 mol.L⁻¹. A leitura da absorvância na derivada de primeira ordem foi efetuada a 320 nm, empregando-se como branco a solução de HCl 0,1 mol.L⁻¹. Como padrão, foi utilizada uma solução de cumarina (1,2-benzopirano), previamente dissolvida em *q.s.* de etanol P.A., e elaborada com HCl 0,1 mol.L⁻¹, na concentração final de 12 µg.mL⁻¹. A determinação quantitativa de cumarinas foi desenvolvida em triplicata.

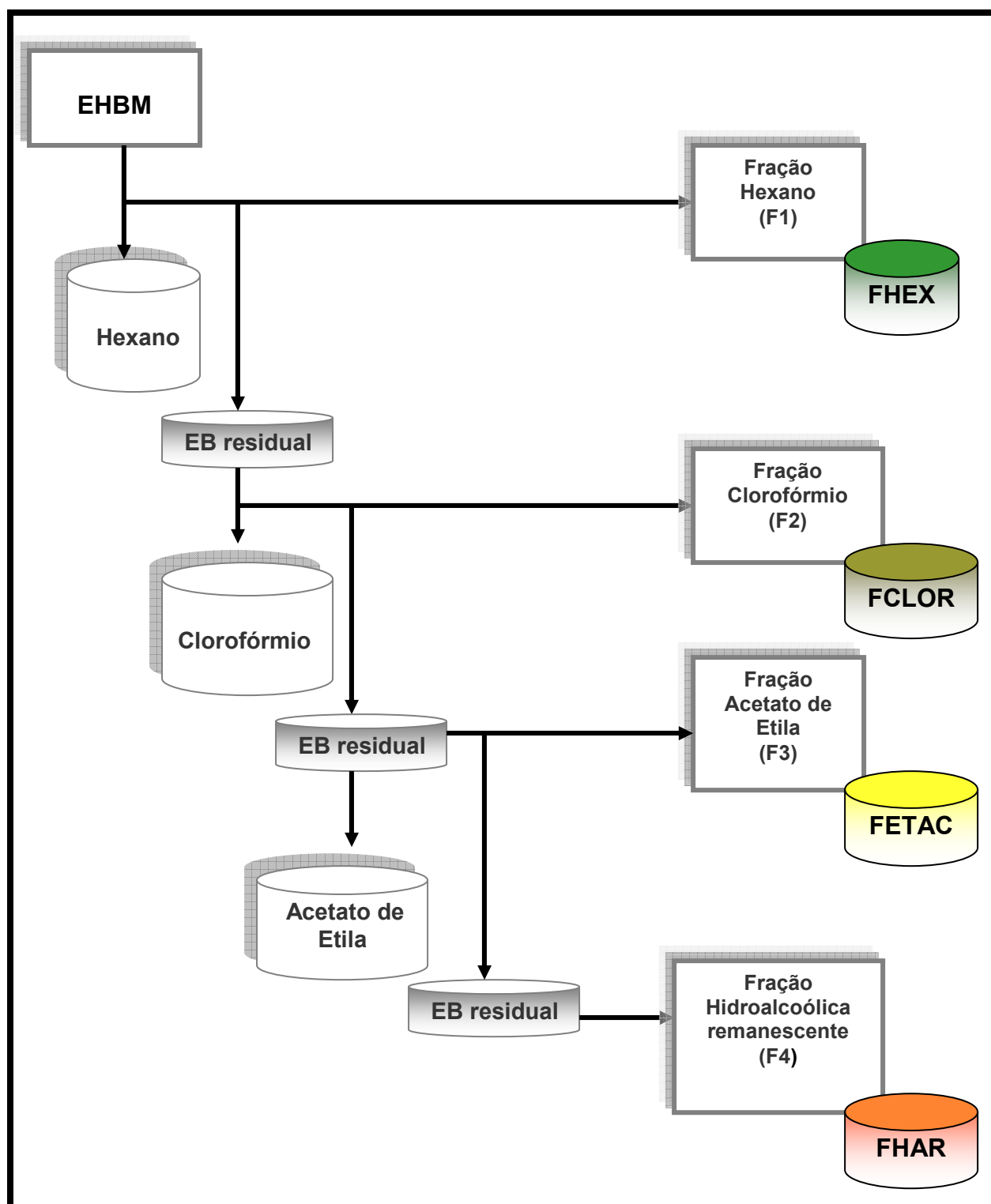


Figura 4 – Esquema do fracionamento do extrato hidroalcoólico bruto de malva (EHBM).

4.4 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS PARA *Malva sylvestris* L.

4.4.1 Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante total foi avaliada para o EHBM e para o gel de hidroxietilcelulose contendo 10% de EHBM (gel tratamento a ser aplicado no estudo clínico) pelo método fosfomolibdênico (triplicata). O método de complexação pelo fosfomolibdênio é baseado na redução de Mo (VI) a Mo (V), contendo compostos antioxidantes. Essa redução possibilita a formação de um complexo verde entre fosfato e molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente em 695 nm (Prieto et al.⁵⁷ 1999).

Uma alíquota de 0,5 mL do EHBM ou uma massa de 5 g do gel de hidroxietilcelulose contendo 10% de EHBM, quantidades que equivalem a 200 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de princípios ativos, foi adicionada a 5 mL de solução reagente (molibdato de amônio 4 mmol L^{-1} + ácido sulfúrico 0,6 mol L^{-1} + fosfato de sódio 28 mmol L^{-1}). Os frascos foram incubados em 95 °C por 90 min. A absorvância foi mensurada 695 nm. O controle foi realizado com ácido ascórbico (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para o cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100 % de atividade antioxidante. Os resultados foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR), conforme a equação 1.

$$AAR = \left(\frac{\text{absorvância da amostra} - \text{absorvância do branco}}{\text{absorvância do ácido ascórbico} - \text{absorvância do branco}} \right) \times 100 \quad (1)$$

4.4.2 Atividade antimicrobiana

Os testes para avaliar a capacidade antimicrobiana da droga vegetal *M. sylvestris* foram conduzidos por meio dos métodos de difusão em ágar: técnica da perfuração em ágar e difusão em disco (Ostroski et al.⁵⁸ 2008).

4.4.2.1 Técnica da perfuração no ágar

Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus mutans* (ATCC25175) e *Streptococcus mitis* (ATCC 49456). Cada inóculo foi preparado em soro fisiológico, padronizado pelo tubo 0,5 da Escala McFarland, a 580 nm, o qual corresponde a aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹. As suspensões de 10^8 células mL⁻¹ de microrganismos foram semeadas (triplicata), em ágar Muller Hinton e incubadas a 37 °C por 10 min. Em seguida, foram confeccionados poços no meio de cultura, com auxílio de cânulas de vidro de 4,0 mm de diâmetro. Os poços foram preenchidos com 6,5 mg das substâncias-teste: gel de malva a 10%, gel de clorexidina 2 % (controle positivo) e gel de hidroxietilcelulose a 3 % (placebo) (Figura 5). O período de incubação foi de 24 e 48 h a 36 °C, sendo em seguida avaliada a presença de halos de inibição.

4.4.2.2 Técnica da difusão em disco

O EHBM foi dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido (DMSO) a 50 % nas concentrações de 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2500 e 5000 µg mL⁻¹. Solução de clorexidina a 2 % foi utilizada como controle positivo e solução aquosa de DMSO a 50 %, como controle negativo. Foram utilizados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus mutans* (ATCC25175) e *Streptococcus mitis* (ATCC 49456).

As suspensões dos microrganismos foram semeadas, em duplicata, em ágar Muller Hinton. Cada placa foi dividida em 11 campos nos quais foram distribuídos os discos, considerando uma distância maior do que 15 mm até a lateral da placa e de modo a não sobrepor as zonas de inibição. Os discos foram preparados com papel filtro de 6 mm de diâmetro, embebidos em 20 µL do EHBM, nas diferentes concentrações testadas, ou em 20 µL das soluções controle.

As placas de Petri foram incubadas em estufa a 36 °C, por 24 e 48h, sendo então analisada a presença de halo de inibição e a concentração mínima passível de limitar o desenvolvimento das colônias bacterianas.

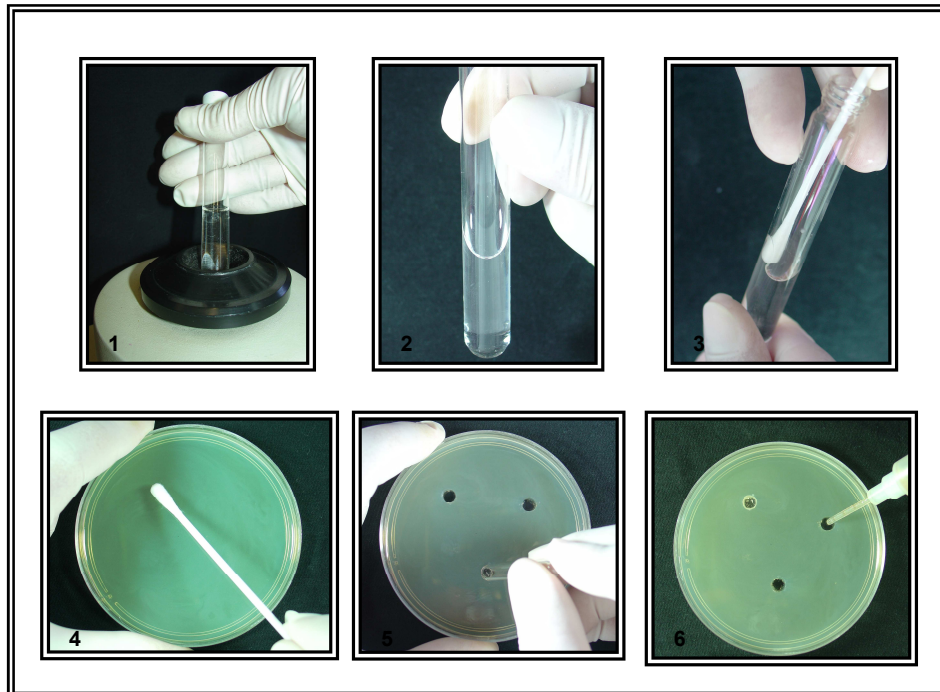


Figura 5 - (1) Homogeneização do microrganismo. (2) Suspensão do microrganismo. (3) e (4) Suspensão microbiana sendo semeada em placas de ágar Muller-Hinton. (5) Confeção dos poços no ágar (6) Adição das substâncias-teste nos poços.

4.5 DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS

4.5.1 Estudos de pré-formulação

O desenvolvimento das formulações empregadas nesta pesquisa, gel do EHBM a 10 % (gel tratamento), gel de digluconato de clorexidina a 2 % (controle positivo) e gel placebo foram manipuladas com hidroxietilcelulose (Natrosol[®], PharmaSpecial[®] – São Paulo – Brasil), no Laboratório de Farmacotécnica Alopática do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG (Tabela 1). Os géis foram elaborados utilizando os procedimentos preconizados de desinfecção e anti-sepsia (Appel, Reus⁵⁹ 2005, Thompson⁶⁰ 2006).

As formulações foram acondicionadas em frascos de polietileno e codificadas para o mascaramento, sendo também submetidas aos ensaios de controle da qualidade.

Tabela 1 – Formulação dos géis empregados na pesquisa

Matéria-prima	Gel Tratamento	Gel Controle Positivo	Gel Controle Negativo
EHBM (%)	10	_____	_____
Digluconato de clorexidina (%)	_____	2	_____
Flavorizante de Cereja (%)	0,50	0,50	0,50
Propilenoglicol (%)	5	5	5
Solução Corante Marrom a 10%	1	1	1
Hidroxietilcelulose (%)	3	3	3
Metilparabeno (%)	0,15	0,15	0,15
Solução de hidróxido de sódio a 20% <i>q.s.</i>	pH 6,50	pH 6,50	pH 6,50
Água Purificada <i>q.s.p</i>	100 g	100 g	100 g
_____ (ausente na formulação)			

4.5.2 Controle da qualidade das formas farmacêuticas

4.5.2.1 Determinação dos valores de pH

Os valores do pH foram obtidos em triplicata com um potenciômetro digital DMPH-2 (Digimed[®], São Paulo, Brasil) previamente calibrado (Farmacopéia ⁶¹ 1988). Considerando os valores obtidos nessa determinação, as formulações foram ajustadas para um valor de pH de 6,50 com uma solução de hidróxido de sódio a 20 % (m/V).

4.5.2.2 Determinação da densidade absoluta

A determinação da densidade relativa foi feita utilizando o método do picnômetro (triplicata). Para o cálculo da densidade absoluta em g mL⁻¹ foi adotada a equação 2 (Farmacopéia ⁶¹ 1988).

$$\mu_{20} = 0,99703.d_{20}^{20} + 0,0012 \quad (2)$$

4.5.2.3 Determinação da consistência

A consistência foi estabelecida por meio do escoamento. A massa de 1,0 g de cada formulação foi depositada sobre uma placa de vidro. Uma segunda placa (750 g) foi colocada de forma paralela sobre a primeira. Após 5 minutos, o diâmetro do halo resultante da aplicação da força foi mensurado com régua graduada em milímetros (Laufer Neto et al.⁶² 2006).

4.5.2.4 Avaliação microbiológica

Para esta análise foi utilizado o kit Newplus I (Newprov[®], Pinhais – Brasil). Os géis foram transferidos, para o caldo Letheen (9,0 mL), para inativar o sistema conservante. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL da suspensão e colocado nos meios Ágar Letheen, Mac Conkey e Sabouraud dextrose. As placas contendo os meios Ágar Letheen e Mac Conkey foram incubadas em estufa (35 ± 0,5 °C), por 24

e 48 h. As placas com o meio Ágar Sabouraud dextrose foram mantidas em temperatura ambiente por 10 dias. Após os períodos determinados, foi avaliado o crescimento bacteriano e fúngico (Pinto et al.⁶³ 2003).

Depois de finalizadas as análises de controle da qualidade, os géis foram acondicionados em seringas opacas de 5 mL para então, serem distribuídas aos voluntários da pesquisa.

4.6 ESTUDO CLÍNICO

4.6.1 Seleção da amostra

Foram recrutados 30 indivíduos de ambos os gêneros, acadêmicos de diferentes cursos de graduação da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Como critério de inclusão os pacientes deveriam ser maiores de 18 anos (entre 18 – 30 anos), possuir pelo menos 24 dentes e no mínimo 1 molar e 1 pré-molar por sextante, não apresentar periodontite (perda clínica de inserção ≥ 3 mm, profundidade de sondagem ≥ 4 mm com supuração e/ou sangramento à sondagem). Não foram selecionados gestantes, pacientes com doenças periodontais agudas, com doenças sistêmicas associadas à doença periodontal, que fizeram uso de antibióticos nos últimos 6 meses ou uso crônico de anti-inflamatórios, que foram submetidos a tratamento periodontal no último ano, portadores de aparelho ortodôntico, lesões cariosas extensas, coroas totais ou próteses fixas envolvendo molares e pré-molares. Todos os exames foram realizados por um examinador previamente treinado e calibrado.

A metodologia aplicada nesse estudo utiliza um método que exclui a ação mecânica de escovação e uso do fio dental nos dentes 15, 16, 35 e 36 com a utilização de moldeiras parciais de polivinila.

4.6.2 Procedimentos clínicos – fase preliminar

Foi realizado um exame preliminar para a seleção dos voluntários. Os indivíduos incluídos no estudo foram submetidos à moldagens parciais (dentes 15,16 e 35,36), para obtenção de modelos de gesso. Sobre os modelos parciais, confeccionou-se previamente uma placa de alívio com uma lâmina de

polivinilacetato com 0,5 mm de espessura (plastificador à vácuo). Esta placa recobriu toda a área dental, atingindo 2 mm além da margem gengival nas faces vestibular e lingual, com o objetivo de fornecer um espaço, para manter o gel em contato com os dentes e a gengiva (Figura 6A). Sobre esta placa de alívio foi confeccionada uma segunda moldeira de polivinilacetato com 2 mm de espessura para facilitar a aplicação das substâncias (Figura 6B) (Nogueira Filho et al.⁶⁴ 2000, Pannuti et al.⁶⁵ 2003).

Nesta fase, os voluntários foram submetidos a dois procedimentos (um por semana) de profilaxia com jato de bicarbonato de sódio, com o objetivo de reduzir o biofilme dental.

Os participantes foram submetidos a 3 tratamentos em um modelo cruzado duplo cego (Figura 7): Tratamento 1- Gel do extrato hidroalcoólico bruto de *Malva sylvestris* a 10%; Tratamento 2- Gel de clorexidina a 2% (controle positivo); Tratamento 3- placebo- gel de hidroxietilcelulose a 3%. O período de tratamento foi de 15 dias com um washout (intervalo entre cada tratamento) de 10 dias (Nogueira Filho et al.⁶⁴ 2000).

Os voluntários receberam um “kit” individual (Figura 8) contendo duas moldeiras parciais individuais (dentes 15,16 e 35,36) em um recipiente próprio para o acondicionamento, uma escova dental, um dentífrício e seringas descartáveis de 5mL contendo o gel a ser utilizado. Os indivíduos foram instruídos a abster-se de qualquer meio de enxaguatório, manter os mesmos métodos de higiene bucal nas outras regiões da boca e não alterar a dieta. Foram recomendadas três escovações diárias, sendo que nestas, deve-se aplicar o gel nas moldeiras em uma quantidade que cubra toda a coroa dental, sendo esta mantida em posição durante todo o procedimento de escovação (Figura 9) (Nogueira Filho et al.⁶⁴ 2000, Pannuti et al.⁶⁵ 2003).

4.6.3 Parâmetros clínicos avaliados

4.6.3.1 Índice de placa

O índice de placa de Silness e Løe⁶⁶ (1964) foi utilizado para verificar o biofilme dental presente nas faces vestibular e lingual dos dentes tratados e controle. Esse método baseia-se nos seguintes escores: 0- Ausência de biofilme

visível ou detectado com sonda; 1- Biofilme dental próximo à margem gengival visível com o uso da sonda periodontal; 2- Acúmulo moderado de biofilme dental, detectado no exame visual, próximo à margem gengival e sem ultrapassar 1/3 do dente; 3- Grande acúmulo de biofilme na superfície dental, ultrapassando 2/3 da face analisada. Para as faces proximais, verificou-se a presença ou ausência do biofilme.

4.6.3.2 Índice de sangramento marginal

A inflamação gengival foi avaliada através do índice de sangramento marginal (Mombelli et al.⁶⁷ 1987) de acordo com os escores: 0- sem sangramento quando se passa a sonda na margem gengival; 1- pontos isolados de sangramento; 2- sangramento forma uma linha contínua na margem cervical; 3- sangramento abundante (Figura 10). Para a verificação do sangramento marginal das faces vestibulares e linguais, a sonda periodontal (Williams, Millenium[®] São Paulo, Brasil), recebeu inclinação de 60° em relação ao longo eixo do elemento dental percorrendo toda a margem gengival (Van der Weijden et al.⁶⁸ 1994). Para as faces proximais analisou-se a presença ou ausência do sangramento marginal à sondagem.

Todos os registros foram realizados sob as mesmas condições e anotados em fichas confeccionadas para o estudo (Apêndice A).

4.6.4 Avaliação do volume do fluido gengival

O fluido gengival foi coletado (duas coletas por dente) sempre na porção central da face vestibular e lingual/palatina (totalizando 08 coletas por paciente em cada exame do estudo). Utilizou-se tiras de papel filtro (Whatman grau I) de 2x15mm. Após a área ter sido seca e o biofilme dental removido, as tiras foram inseridas 1 mm abaixo da margem gengival e permanecendo por 30 segundos (Figura 11). As tiras foram armazenadas em frascos plásticos e em seguida coradas com solução alcoólica de ninhidrina a 0,2%. As tiras foram fotografadas e as imagens analisadas com um programa computador (Image Pro Plus[®] Version 4.5.0.29, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para determinação da quantidade de fluido absorvido em mm² (Chioca et al.⁶⁹ 2005).

4.6.5 Calibração do examinador

Previamente à fase experimental, o examinador foi treinado e calibrado para o índice de placa. Durante o período de treinamento e calibração foram examinados 8 pacientes, de ambos os gêneros, com idades entre 18 e 30 anos, com condições semelhantes aos voluntários selecionados para a pesquisa. O índice foi aplicado nas faces vestibulares e linguais dos pré-molares e molares em dois momentos com intervalo de 20 minutos. Para o índice de sangramento não foi realizada calibração, devido à tendência do sangramento ser aumentado pela sondagem repetida no mesmo local. Portanto, para o índice de sangramento foi realizado um treinamento através de projeção de fotos clínicas e discussão dos parâmetros com um segundo examinador (8 pacientes com as mesmas condições da pesquisa).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A concordância intra-examinador do índice de placa (variável ordinal) foi testada com o teste Kappa ponderado. Previamente à análise estatística, a normalidade dos dados foi testada com o teste de Shapiro-Wilks, sendo evidenciada uma distribuição não normal (Apêndice B). Desta forma, optou-se pela aplicação de modelos não paramétricos.

As comparações entre os parâmetros clínicos (índice de placa, sangramento marginal e quantidade de fluido gengival) inicial e final entre os grupos (inter-grupos) foi realizada com o teste de Friedman para dados pareados, se encontradas diferenças significativas, as comparações múltiplas seriam realizadas como o pós-teste de Dunn. As comparações entre os parâmetros clínicos iniciais e finais (intra-grupo) foi realizada com o teste de Wilcoxon. O indivíduo foi utilizado como unidade amostral.

Para as comparações dos parâmetros clínicos, presença de biofilme e sangramento marginal (presença ou ausência) nas faces interproximais, os indivíduos foram classificados em escores de acordo com a prevalência de sítios positivos, sendo: Escore 1- Sítios positivos < 25% (baixa prevalência); Escore 2- $25\% \leq$ Sítios positivos < 75% (prevalência moderada) e Escore 3- Sítios positivos $\geq$

75% (alta prevalência). As comparações inter e intra-grupos foram realizadas da mesma forma como descrito anteriormente.

O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados com os pacotes estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Science) versão 17.0 (SPSS Inc Chigaco Illinois USA) e GraphPad Prism versão 5.00 for Windows (GraphPad Software. São Diego, Califórnia, USA).

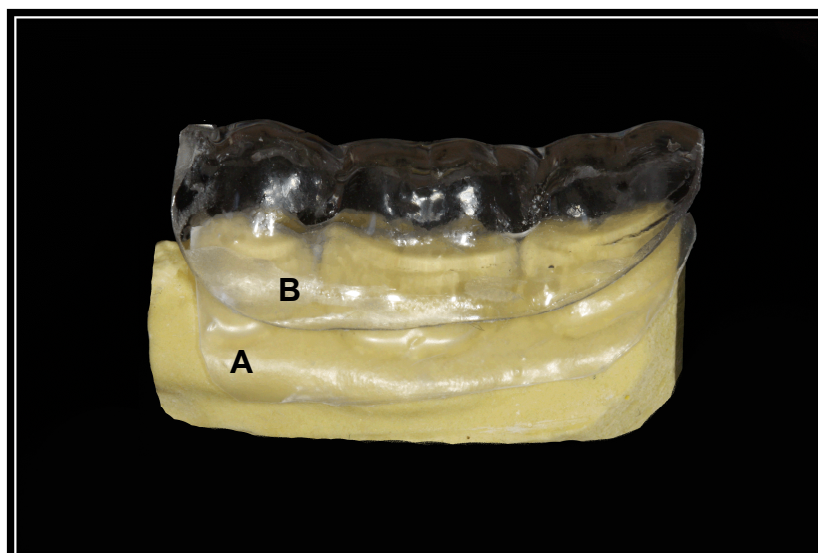


Figura 6 - (A) Placa de alívio de polivinilacetato com 0,5mm de espessura, confeccionada sobre o modelo de gesso, sendo o alívio para a confecção da moldeira individual. (B) Moldeira parcial (dentes 15 e 16; 35 e 36) individual de polivinilacetato com 2,0 mm de espessura.

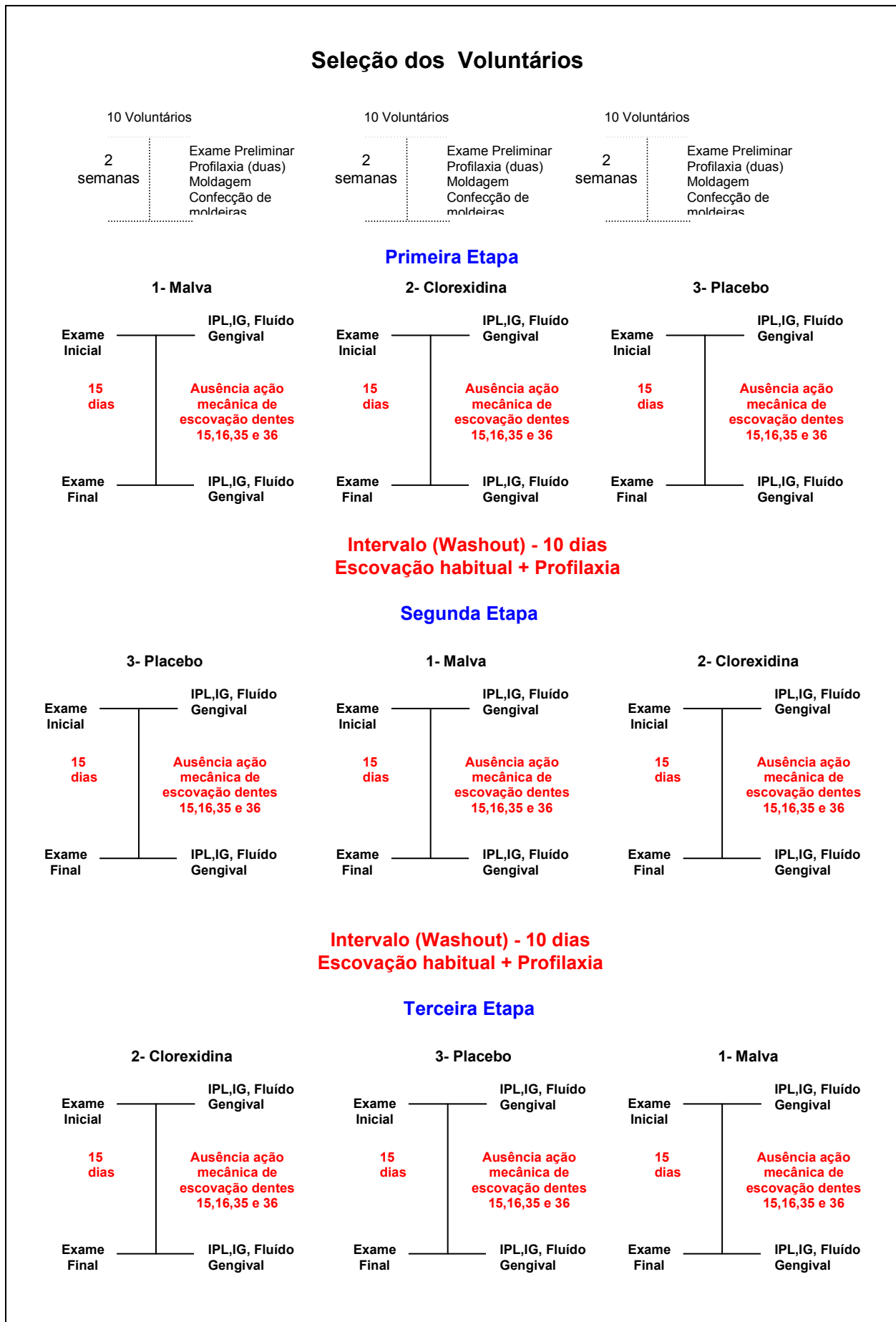


Figura 7 – Desenho experimental do estudo clínico.



Figura 8 - "Kit Individual": (A) Moldeiras individuais acondicionadas em porta moldeiras (B) seringa contendo o gel a ser utilizado (C) e (D) escova dental e dentifrício padronizados.

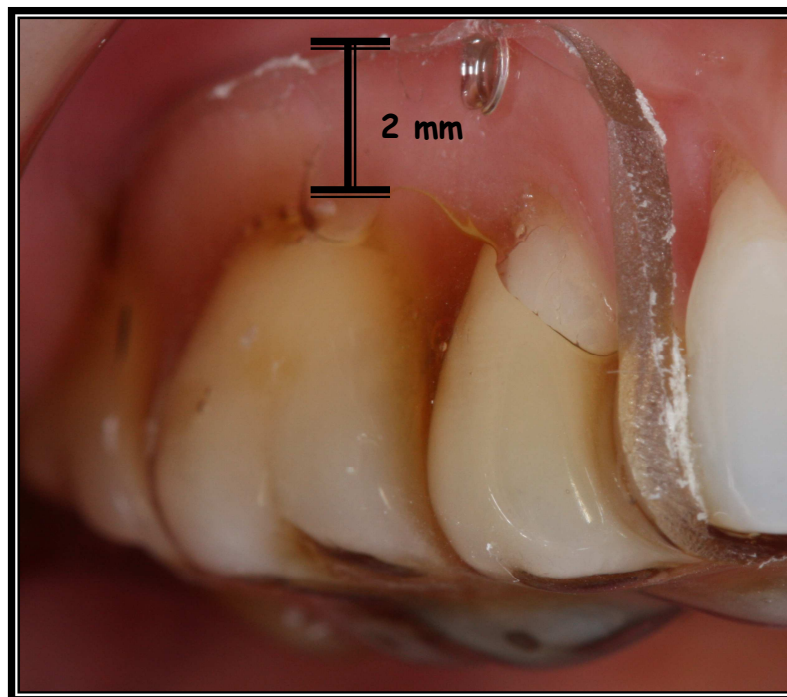


Figura 9- Moldeira em posição na boca, envolvendo 2 mm além da margem gengival observando-se o contato do gel com o dente e a gengiva.

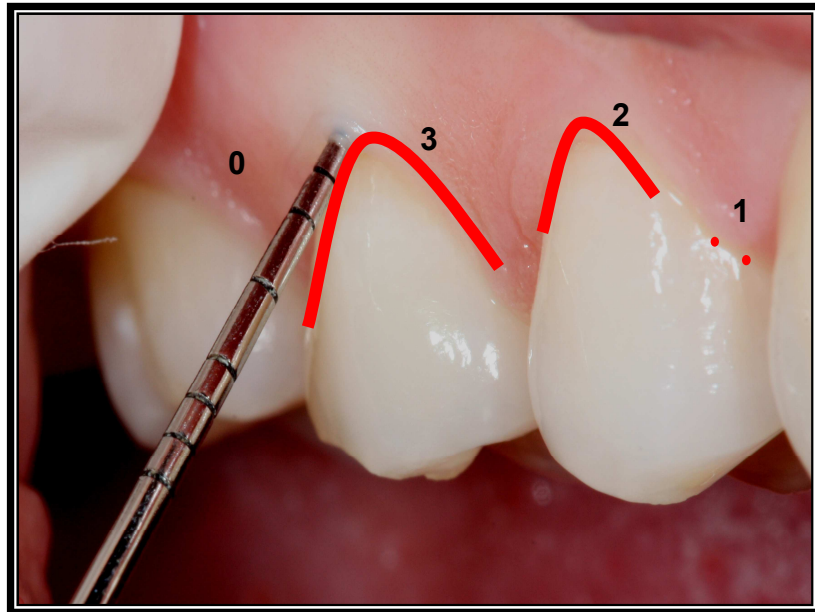


Figura 10 – Índice de sangramento marginal à sondagem.

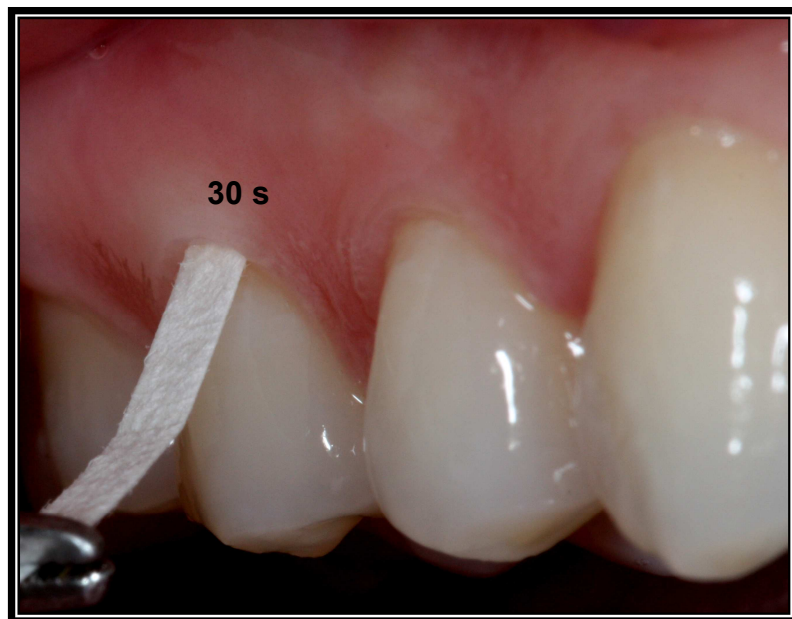


Figura 11 - Coleta do fluido gengival com papel filtro 1 mm abaixo da margem gengival por 30 segundos.

5 RESULTADOS

5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO

5.1.1 Marcha sistemática fitoquímica

5.1.1.1 Ensaios fitoquímicos qualitativos

A Tabela 2 sumariza os metabólitos secundários presentes nas folhas de *M. sylvestris*, analisados a partir das frações provenientes do EHB.

Tabela 2 - Pesquisa de metabólitos secundários no EHB de *M. sylvestris*

METABÓLITO SECUNDÁRIO	RESULTADOS			
	FHEX	FCLOR	FETAC	FHAR
Esteróides e/ou Triterpenos				
- Reação de Liberman-Bouchard	(+)	(+)	(-)	----
Cumarinas	(-)	(+)	(+)	(+)
Alcalóides				
- Reação com reativo de Dragendorff	(-)	(-)	(-)	(-)
- Reação com reativo de Mayer	(-)	(-)	(-)	(-)
- Reação com reativo de Bouchardat	(-)	(-)	(-)	(-)
- Reação com reativo de Bertrand	(-)	(-)	(-)	(-)
Glicosídeos antraquinônicos	(-)	(+)	(+)	(+)
Glicosídeos flavônicos				
- Reação de Shinoda	(-)	(-)	(-)	(+)
- Reação oxalo-bórica	(-)	(-)	(-)	(+)
- Reação de Pacheco	(-)	(-)	(-)	(-)
- Reação com zinco	(-)	(-)	(-)	(+)
Glicosídeos saponínicos	----	----	(-)	(-)
Taninos				
- Reação com Cloreto Férrico 1%	----	----	----	(+)
- Reação com ácido nitroso	----	----	----	(-)
- Reação com gelatina a 2,5%	----	----	----	(+)
- Reação com sulfato de ferro amoniacal 5%	----	----	----	(+)

(-) negativo; (+) positivo; (---) não testado.

As frações apolares, submetidas à reação de Liebermann-Burchard para esteróides e/ou triterpenos (Farnsworth⁵⁰ 1966), demonstraram resultado positivo, apresentando uma coloração rosada. Para a pesquisa de alcalóides, todas as frações do extrato hidroetanólico não indicaram a formação de precipitados característicos (Evans⁵¹ 1989). A reação de Bornträger para glicosídeos antraquinônicos (Evans⁵¹ 1989) revelou a formação da coloração avermelhada que assinala a presença desse metabólito.

Para cumarinas, foi observado o desenvolvimento de fluorescência na câmara de ultravioleta (365 nm) (Harborne⁵² 1998), a partir das frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica residual. A presença de glicosídeos flavônicos foi determinada a partir de quatro diferentes reações. Durante as avaliações, observou-se que a fração hidroalcoólica residual submetida às reações de Shinoda, oxalobórica e Pacheco, apresentou resultado positivo, indicando a ocorrência de glicosídeos flavônicos no EHBM.

A não formação de espuma nas frações acetato de etila e hidroalcoólica residual caracterizou a ausência de glicosídeos saponínicos (Simões et al.⁴⁹ 2004). Os ensaios qualitativos com gelatina, cloreto férrico, sulfato de ferro amoniacal (Harborne⁵² 1998, Simões et al.⁴⁹ 2004) comprovaram a presença de taninos no EHBM.

Considerando os resultados dos ensaios fitoquímicos qualitativos, o estudo quantitativo do EHBM foi conduzido para as mucilagens (metabólito primário), para os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos) e para as cumarinas (metabólitos secundários).

5.1.1.2 Ensaios fitoquímicos quantitativos

Os teores das mucilagens, compostos fenólicos totais e cumarinas obtidos por meio do estudo quantitativo do EBHM para *M. sylvestris* avaliada, estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 - Estudo quantitativo dos metabólitos primário e secundários* (média e desvio padrão) para *M. sylvestris* em estudo, a partir da avaliação do EHBM

Metabólito	Resultados
Mucilagem	12,6 ± 0,3 g/100 g planta seca
Fenólicos Totais	137,26 ± 18,81 mg EAG [#] /100 g planta seca
Cumarinas	293,97 ± 22,45 mg/100 g planta seca

* Triplicata, [#] EAG (equivalente de ácido gálico)

5.2 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.2.1 Atividade Antioxidante Total

Os resultados da avaliação da capacidade antioxidante do EHBM e do gel de malva a 10%, utilizando o método do fosfomolibdênio foram expressos na forma de atividade antioxidante relativa (AAR_%) na tabela 4.

Tabela 4 – Atividade antioxidante total (média e desvio padrão) do EHBM* e do gel tratamento*

Amostras	AAR _%
EHBM	5,75±1,38
Gel de hidroxietilcelulose contendo 10% de EHBM	26,30±0,04

* Triplicata

A média AAR_% do EBHM foi igual a 5,75% e do gel tratamento, 26,30%, em relação a 100% do total de atividade antioxidante atribuída ao ácido ascórbico.

5.2.2 Atividade Antimicrobiana

O EHBM não apresentou de acordo com metodologia empregada ação antimicrobiana contra as cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans* e *S. mitis*. Não

foi observada a formação de halo de inibição tanto para o método da difusão em disco quanto para a técnica da perfuração no ágar.

5.3 DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS

5.3.1 Controle da qualidade das formas farmacêuticas

5.3.1.1 Determinação dos valores de pH

A tabela 5 resume os resultados encontrados no teste físico-químico de pH.

Tabela 5 – Análises físico-químicas de pH* (média e desvio padrão) das formulações

Formulações empregadas na pesquisa	Sem correção de pH	Após correção de pH
Gel de malva 10%	4,66 ±0,32	6,50 ±0,30
Gel de clorexidina 2%	5,81 ±0,25	6,50 ±0,27
Gel de hidroxietilcelulose 3%	5,61 ±0,28	6,50 ±0,25

*Triplicata

5.3.1.2 Determinação da densidade absoluta

A tabela 6 mostra os resultados relativos à densidade absoluta (μ_{20}).

Tabela 6 – Análises de densidade absoluta* (média e desvio padrão) das formulações

Formulações empregadas na pesquisa	Densidade Absoluta (μ_{20}) (g mL⁻¹)
Gel de malva 10%	1,09 ±0,05
Gel de clorexidina 2%	1,02 ±0,07
Gel de hidroxietilcelulose 3%	1,05 ±0,04

*Triplicata

5.3.1.3 Determinação da consistência

Os resultados obtidos nos ensaios de consistência são apresentados na tabela 7.

Tabela 7 – Análises de consistência* (média e desvio padrão) das formulações

Formulações empregadas na pesquisa	Consistência (mm)
Gel de malva 10%	64 ± 3,1
Gel de clorexidina 2%	62 ± 2,6
Gel de hidroxietilcelulose 3%	58 ± 2,2

*Triplicata

5.3.1.4 Avaliação microbiológica

Não se observou crescimento bacteriano ou fúngico nos meios de cultura utilizados para todas as formulações, indicando a adequação ao uso proposto na pesquisa.

As características físico-químicas e microbiológicas das formulações caracterizam e aprovam as formulações para o uso proposto.

5.4 ESTUDO CLÍNICO

Do total de 30 pacientes, 5 foram excluídos, sendo que 3 não cumpriram o protocolo experimental determinado e 2 não retornaram para a segunda avaliação. Não foi observado nenhum efeito adverso com o uso das substâncias durante as fases experimentais.

5.4.1 Análise dos parâmetros clínicos

5.4.1.1 Concordância intra-examinador

Os resultados da análise de reprodutibilidade intra-examinador para a avaliação do biofilme dental são apresentados na tabelas 8 e 9.

Tabela 8 - Teste Kappa para o índice de placa (Løe & Silness) nas faces vestibular e lingual.
Concordância intra-examinador realizado em dois exames com intervalo de 20 minutos

		Avaliação -2				
Avaliação -1	ESCORES	0	1	2	3	Total
	0	33	0	0	0	33
	1	18	43	0	0	61
	2	0	11	59	0	70
	3	0	0	12	16	28
Total		51	54	71	16	192

K=0,703 – Concordância considerada boa.

Tabela 9 - Teste Kappa para o índice de placa (presença e ausência) nas faces proximais.
Concordância intra-examinador realizado em dois exames com intervalo de 20 minutos

		Avaliação -2		
Avaliação -1	ESCORES	0	1	Total
	0	29	2	31
	1	22	331	353
	Total	51	333	384

K=0,675 – Concordância considerada boa

5.4.1.2 Índice de placa

O resultado da análise do índice de placa nos diferentes grupos experimentais estão expressos nos gráficos 1, 2, 3 e 4.

Os resultados mostraram que o índice de placa final de todas as faces (vestibular e lingual) e também com as mesmas analisadas separadamente foi semelhante. O grupo tratado com clorexidina apresentou os menores valores, não sendo observadas diferenças entre os grupos placebo e malva.

O gráfico 4 apresenta os dados referentes à presença de biofilme nas faces proximais. Os voluntários foram classificados de acordo com a prevalência de sítios com presença de biofilme, sendo estabelecidos os escores de presença de biofilme (EPB): EPB- 1: presença de biofilme < 25% dos sítios; EPB- 2: 25% ≤ presença de biofilme < 75% dos sítios e EPB- 3: Presença de biofilme ≥ 75% dos sítios. Foi possível verificar um aumento da prevalência dos sítios com biofilme nos grupos placebo e clorexidina, não sendo observado no grupo tratado com malva.

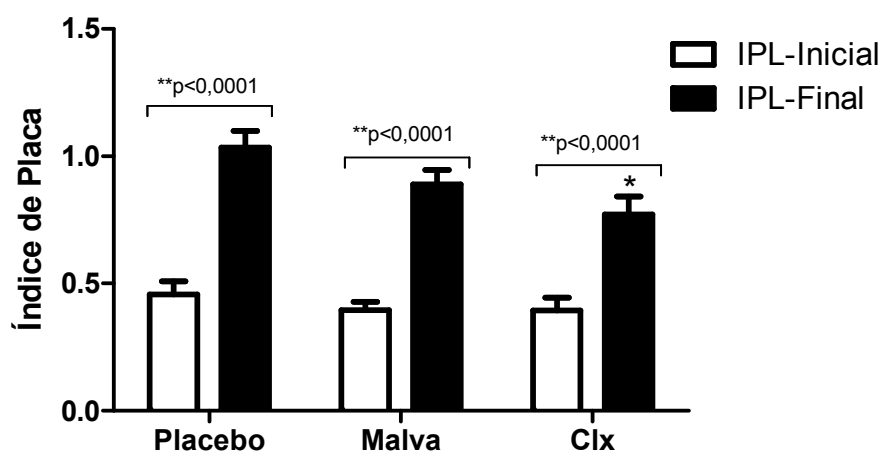


Gráfico 1- Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: IPL inicial- $p=0,7301$ (diferença não significativa); IPL final- $p=0,0056$ (diferença significativa), * $p<0,01$ em comparação ao placebo (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), **diferença estatística significativa entre os valores do índice de placa inicial e final (Teste de Wilcoxon).

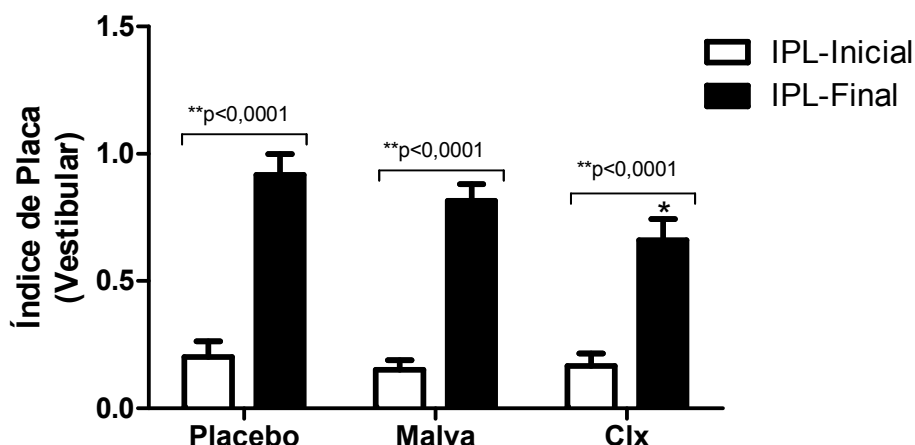


Gráfico 2- Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final na face vestibular para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: IPL inicial- $p=0,3281$ (diferença não significativa); IPL final- $p=0,0175$ (diferença significativa), $*p<0,05$ em comparação com placebo (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), **diferença estatística significativa entre os valores do índice de placa inicial e final (Teste de Wilcoxon).

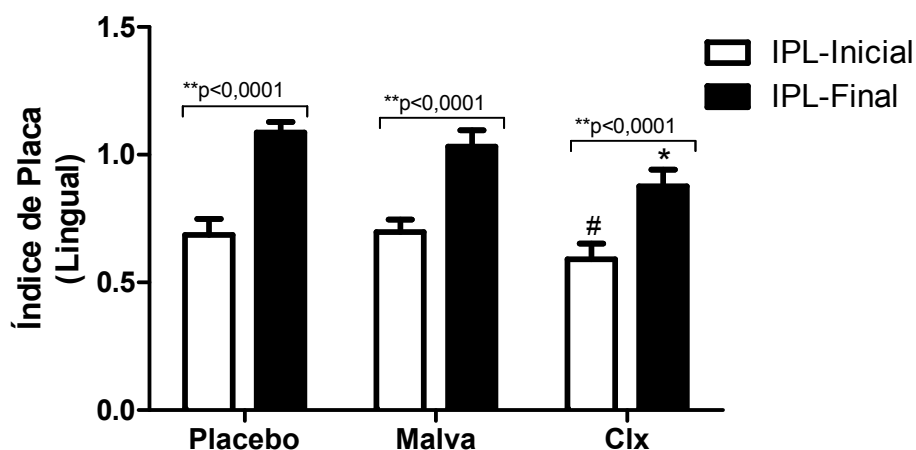


Gráfico 3- Média e erro padrão dos valores do índice de placa (IPL) inicial e final na face lingual para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: IPL inicial- $p<0,0001$ (diferença significativa), $\#p<0,01$ em comparação com placebo e malva; IPL final- $p=0,0355$ (diferença significativa), $*p<0,05$ em comparação com placebo (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), **diferença estatística significativa entre os valores do índice de placa inicial e final (Teste de Wilcoxon).

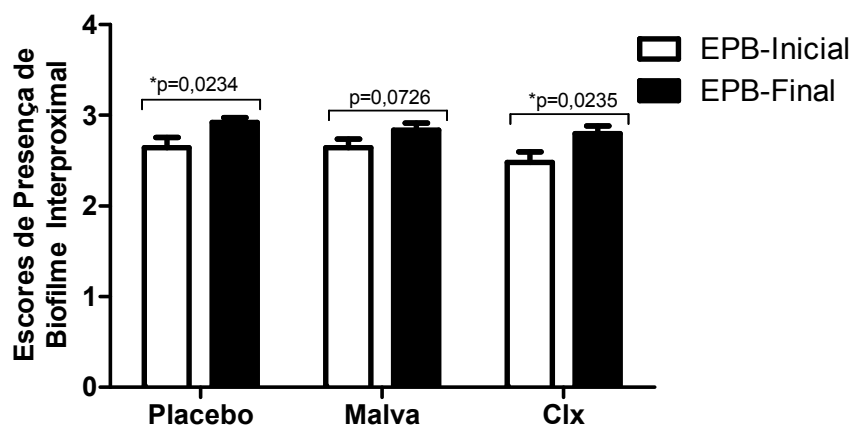


Gráfico 4- Média e erro padrão dos valores dos escores de presença de biofilme interproximal de acordo com o número de sítios, sendo: 1- Presença Biofilme < 25% (nenhum ou pouco sítios com presença de biofilme); 2- $25\% \leq$ Presença de biofilme < 75% (moderado) e 3- Presença de Biofilme $\geq 75\%$ (muitos sítios com presença de Biofilme). Escores de presença de biofilme (EPB) inicial e final nas faces proximais para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: EPB inicial- $p=0,5836$ (diferença não significativa). EPB final- $p=0,4966$ (Teste de Friedman). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), *diferença estatística significativa entre EPB inicial e final (Teste de Wilcoxon).

5.4.1.3 Índice de sangramento marginal

O resultado da análise do índice de sangramento marginal nos diferentes grupos experimentais está expresso nos gráficos 5, 6, 7 e 8.

Os resultados mostraram que o índice de sangramento marginal final de todas as faces (vestibular e lingual) e também com as mesmas analisadas separadamente foram semelhantes, sem diferenças significativas entre os grupos.

O gráfico 8 apresenta os dados referentes à presença de sangramento marginal nas faces proximais. Os voluntários foram classificados de acordo com a prevalência de sítios com presença de sangramento marginal, sendo estabelecidos os escores de presença de sangramento marginal (EPSM): EPSM 1- Presença de sangramento marginal < 25% (nenhum ou pouco sítios com presença de sangramento); EPSM 2- $25\% \leq$ Presença de sangramento < 75% (moderado) e EPSM 3- Presença de sangramento $\geq 75\%$ (muitos sítios com presença de sangramento). Não sendo encontradas diferenças entre os grupos quanto a prevalência de sangramento marginal.

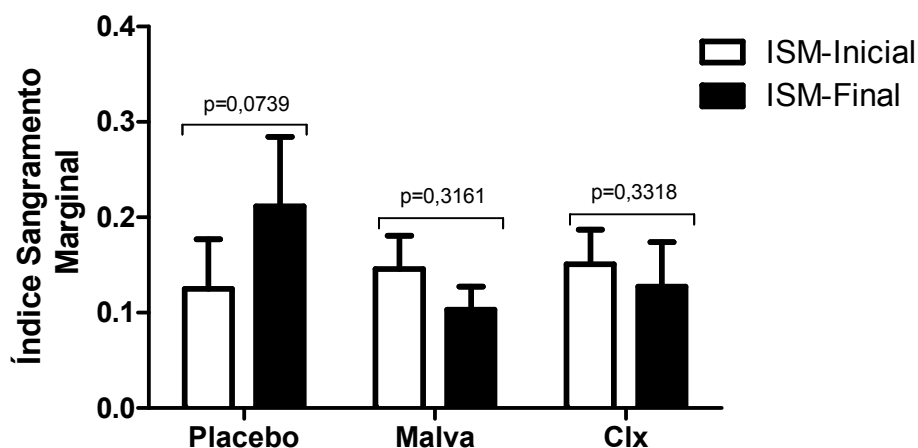


Gráfico 5- Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: ISM inicial- $p=0,5849$ (diferença não significativa); ISM final- $p=0,2972$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre os valores do índice de sangramento marginal inicial e final (Teste de Wilcoxon).

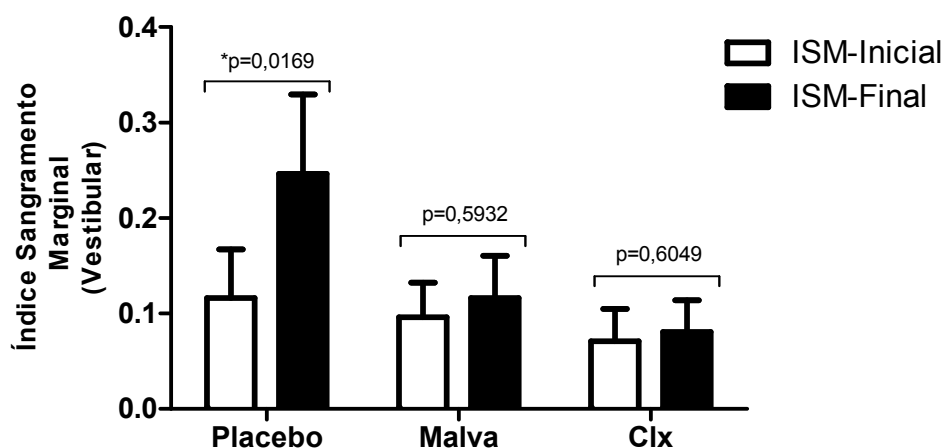


Gráfico 6- Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final na face vestibular para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: ISM inicial- $p=0,6570$ (diferença não significativa); ISM final- $p=0,1626$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), *diferença estatística significativa entre os valores do índice de sangramento marginal inicial e final (Teste de Wilcoxon).

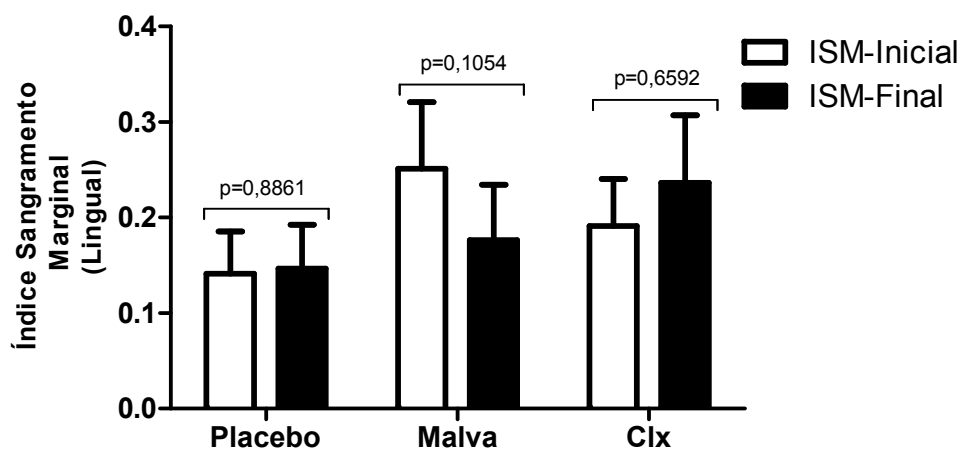


Gráfico 7- Média e erro padrão dos valores do índice de sangramento marginal (ISM) inicial e final na face lingual para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: ISM inicial- $p=0,1085$ (diferença não significativa); ISM final- $p=0,4189$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre os valores do índice de sangramento marginal inicial e final (Teste de Wilcoxon).

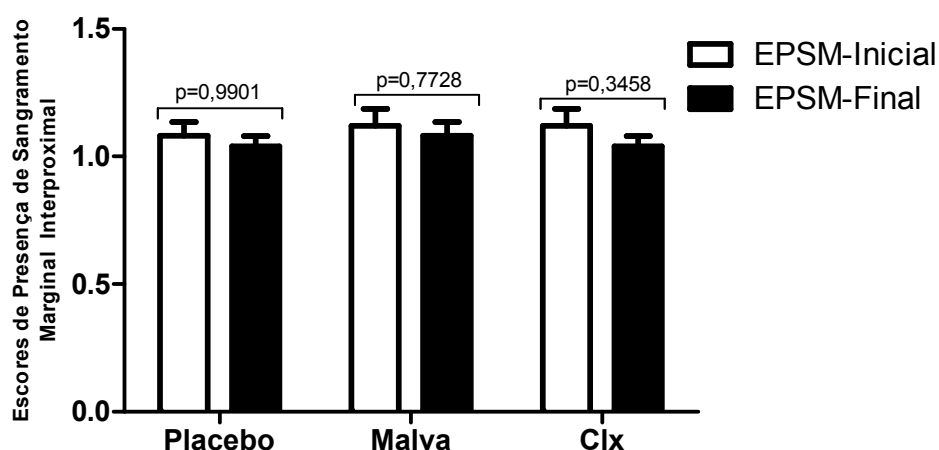


Gráfico 8- Média e erro padrão dos valores dos escores de presença de sangramento marginal interproximal de acordo com o número de sítios, sendo: 1- Presença de Sangramento Marginal $< 25\%$ (nenhum ou pouco sítios com presença de sangramento); 2- $25\% \leq$ Presença de Sangramento $< 75\%$ (moderado) e 3- Presença de Sangramento $\geq 75\%$ (muitos sítios com presença de Sangramento). Escores de presença de sangramento marginal (EPSM) inicial e final nas faces proximais para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: EPSM inicial- $p=0,8669$ (diferença não significativa). EPSM final- $p=0,7788$ (Teste de Friedman). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre EPSM inicial e final (Teste de Wilcoxon).

Não foram encontradas diferenças estatísticas significantes para a inflamação gengival após o período de tratamento (15 dias) entre os grupos experimentais tanto na região vestibular quanto na região lingual/palatina nos dentes tratados.

5.4.2 Avaliação do volume do fluido gengival

Os resultados da análise da quantidade de fluido gengival absorvido nas tiras (mm^2) são apresentados no gráfico 9. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, considerando a análise intra-grupo e inter-grupo.

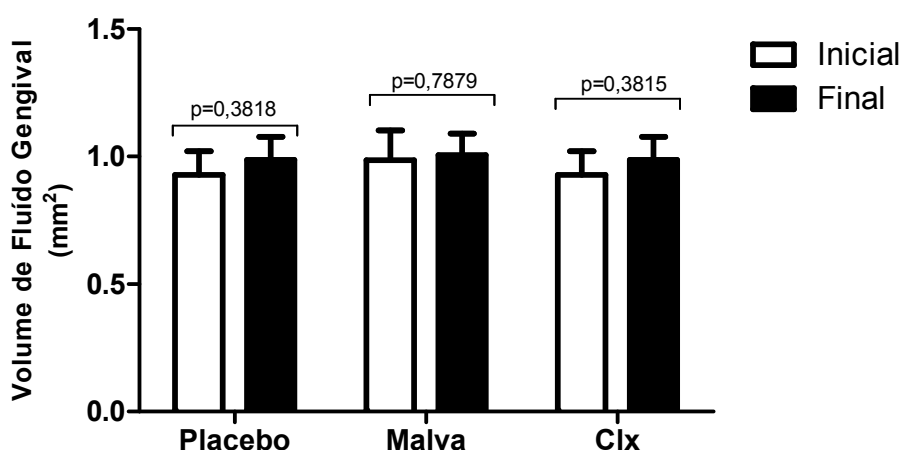


Gráfico 9- Média e erro padrão do volume de fluido gengival (mm^2) absorvido em papel filtro. Valores inicial e final para os diferentes tratamentos: Gel placebo, Gel de malva 10% e Gel de clorexidina 2% (Clx). Comparação inter-grupo: Inicial- $p=0,1409$ (diferença não significativa); Final- $p=0,9608$ (diferença não significativa) (Teste de Friedman com pós teste de Dunn). Intra-grupo (inicial e final no mesmo grupo), diferença estatística não significativa entre os volumes de fluido gengival inicial e final (Teste de Wilcoxon).

6 DISCUSSÃO

Com o objetivo de evidenciar as substâncias (metabólitos secundários/primários) responsáveis pelas ações farmacológicas da droga vegetal *M. sylvestris*, realizou-se a análise fitoquímica qualitativa e quantitativa. No presente estudo, a presença dos metabólitos secundários esteróides e/ou triterpenos, cumarinas, antraquinonas, flavonoides e taninos (compostos fenólicos) foram confirmados no EHBM. Estes resultados estão de acordo com os relatos da literatura, nos quais é possível verificar que os esteróides, particularmente o campesterol, estigmasterol e γ -sitosterol estão presentes na *M. sylvestris* (Conforti et al.⁴² 2008). Os terpenóides estão relacionados à atividade antibacteriana (Samy, Gopalakrishnakone⁷⁰ 2008), bem como o sitosterol e o estigmasterol têm sido empregados como matérias-primas para a indústria farmacêutica, na obtenção de anti-inflamatórios esteroidais (Bruneton⁷¹ 1991).

Os ensaios efetuados para taninos e glicosídeos flavônicos, que revelaram a formação de complexos insolúveis, a presença de precipitados característicos ou o aparecimento de colorações específicas, determinando positividade para esses metabólitos no EHBM, concordam com as evidências relatadas no estudo de Conforti et al.⁴² (2008) que quantificou esses metabólitos a partir de um extrato hidroalcoólico de malva. Os taninos são substâncias que auxiliam no processo cicatricial (feridas, queimaduras) e inflamações através da formação de uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre a mucosa/pele danificada, ocorrendo abaixo desta, a reestruturação do epitélio e formação de vasos (Santos, Mello⁷² 2004). O crescimento de fungos, bactérias e vírus foi inibido pelos taninos e verificou-se também suas propriedades antimicrobianas (Cowan⁷³ 1999). Os flavonóides, a partir da sua diversidade estrutural, possuem atividade antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, entre outras (Zuanazzi, Montanha⁷⁴ 2007, Samy, Gopalakrishnakone⁷⁰ 2008).

Os ensaios para identificar a presença de cumarinas e glicosídeos antraquinônicos no EHBM demonstraram resultados positivos. As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais e possuem diversas propriedades farmacológicas, como atividade imunossupressora, vasodilatadora, antiespasmódica, antimicrobiana e antiviral (Kuster, Rocha⁷⁵ 2004, Samy,

Gopalakrishnakone⁷⁰ 2008). As antraquinonas possuem atividade laxante predominante, além de efeito potencial como antibacteriano, antifúngico, antiviral e antitumoral (Simões et al.⁴⁹ 2004).

Ponderando as informações relatadas nos trabalhos prévios, é possível afirmar que os resultados obtidos por meio do *screening* fitoquímico para as frações procedentes do EHBM está em conformidade com os metabólitos secundários usualmente evidenciados para a espécie vegetal *M. sylvestris*. Além disso, é possível postular o potencial efeito anti-inflamatório e/ou antimicrobiano da espécie no caso específico de afecções bucais, como a gengivite e a periodontite.

O resultado do estudo fitoquímico quantitativo obtido para as mucilagens está condizente com a literatura, que relata a presença em torno de 10-20% desse polissacarídeo heterogêneo na espécie *M. sylvestris* (Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008). As mucilagens são constituintes naturais do vegetal e apresentam ação anti-inflamatória e protetora das mucosas digestiva, respiratória e cutânea (Alonso³⁹ 1998). O revestimento protetor formado pelas mucilagens, devido à sua natureza coloidal, atua impedindo a ação de substâncias irritantes e de bactérias sobre a mucosa (Schulz et al.⁷⁶ 2002).

Em comparação com os valores obtidos para as mucilagens, resultados menos expressivos, na ordem de miligramas, foram verificados na quantificação de compostos fenólicos e de cumarinas. Entretanto, essas quantidades presentes desses metabólitos secundários são passíveis de gerar respostas biológicas, como as mencionadas anteriormente.

Os teores reduzidos de substâncias fenólicas (137,26 mg EAG/100 g de planta seca) observados nesta pesquisa estão de acordo com os estudos de Asolini et al.⁷⁷ (2006) e de Conforti et al.⁴² (2008) que quantificaram esses compostos por meio do método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, utilizando o ácido gálico como padrão de referência.

Diversas alterações patológicas da cavidade bucal, como o câncer bucal, estão relacionadas ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo leva a danos em lipídeos, DNA, proteínas e organelas celulares, provocando alterações da estrutura e função celulares, que podem resultar no desenvolvimento de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, entre outras. O consumo de substâncias antioxidantes naturais (presentes nas plantas) pode inibir a formação de radicais livres (substâncias reativas) e estão associados a uma menor incidência de

eventos relacionados ao estresse oxidativo. Os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido ascórbico, a vitamina E, os carotenóides e os compostos fenólicos (Asolini et al.⁷⁷ 2006, Lima et al.⁷⁸2006).

A atividade antioxidante do EHBM e do gel de hidroxietilcelulose com 10% de EHBM, empregado no estudo clínico, foi avaliado pelo método fosfomolibdênico. O ensaio do fosfomolibdênio ou de redução do complexo fosfomolibdênico tem sido utilizado para avaliar a capacidade antioxidante total de diversas substâncias, a partir da redução do molibdênio (VI) (Mo^{+6}) para molibdênio (V) (Mo^{+5}), com a formação de um complexo fosfato- Mo^{+5} de coloração verde, em pH ácido (Prietto et al.⁵⁷ 1999).

De acordo com os resultados apresentados, o EHBM e o gel tratamento demonstraram uma pequena disponibilidade eletrônica capaz de reduzir o complexo fosfomolibdênico, o que denota uma reduzida atividade antioxidante pelo método utilizado.

A atividade antioxidante de compostos vegetais pode ser atribuída a vários mecanismos, entre elas, a capacidade sequestrante de radicais livres. Os resultados obtidos no ensaio fosfomolibdênico, condizem com estudo de Ferreira et al.⁷⁹ (2006) que verificaram uma pequena atividade sequestrante (menor que 5%) de radicais livres DPPH (1,1 –difetil-1,2-picril hidrazil) em um extrato hidroalcoólico de malva.

Os compostos fenólicos presentes em vegetais são os principais componentes com atividade antioxidante. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (Lima et al.⁷⁸ 2006). Dessa forma, a reduzida atividade antioxidante observada pode ser justificada pela pequena quantidade de compostos fenólicos detectados no EHBM.

O estudo da atividade antimicrobiana in vitro demonstrou que o EHBM não possui ação antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. mutans* e *S. mitis*. Diferentemente destes resultados, Alves et al.⁸⁰ (2009) observaram em sua pesquisa que os microrganismos *S. mutans* e *S. sobrinus* foram sensíveis ao extrato da malva. Entretanto, os resultados deste estudo condizem com a pesquisa de Bonjar⁸¹ (2004), o qual verificou que o extrato de malva não possui atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. cereus*, *B. pumilus*. Este resultado também está

de acordo com o estudo de Souza et al.⁴³ (2004) que observaram que os microrganismos *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *M. luteus* foram resistentes ao extrato metanólico de malva.

O efeito antiplaca e antigengivite do EHBM foi verificado utilizando-se um modelo de gengivite experimental parcial em humanos, sendo os voluntários submetidos a todos os tratamentos do estudo, gel placebo, gel de clorexidina 2% e gel de malva 10% em um modelo cruzado duplo-cego (Nogueira Filho et al.⁶⁴ 2000). Foi avaliado o índice de placa, o índice de sangramento marginal e o fluido gengival inicial e final em cada etapa do estudo.

O índice de placa de Silness e Løe⁶⁶ (1964) é amplamente utilizado na literatura, e foi escolhido para quantificar o acúmulo de biofilme dental (Albert-Kiszely et al.¹⁸ 2007, Baumgartner et al.⁸² 2009). Assim como outros índices, este instrumento de avaliação apresenta certo grau de subjetividade. Portanto, para assegurar a reprodutibilidade, as avaliações foram executadas por um único examinador previamente calibrado, que obteve Kappa = 0,703. Nas faces proximais foi analisada apenas a presença e a ausência do biofilme, sendo o Kappa = 0,675 (valores superiores a 0,60 são considerados adequados para ensaios clínicos).

A condição gengival foi avaliada através de sangramento marginal à sondagem, critério empregado também por outros estudos que avaliaram as propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias de agentes utilizados na forma de gel e colutórios (Albert-Kiszely et al.¹⁸ 2007, Schiffner et al.⁸³ 2007, Trombelli et al.⁸⁴ 2008). Este índice foi escolhido porque se baseia em um achado clínico (sangramento marginal), claramente definido de acordo com os critérios de Mombelli et al.⁶⁷ (1987). Todavia, a sondagem marginal inviabiliza a calibração, pois um segundo exame, poderia causar um sangramento adicional, mascarando o resultado. Desta forma, realizou-se apenas um treinamento clínico e não a calibração prévia do examinador.

Em ambos os critérios de avaliação, optou-se pelo exame de elementos específicos (15, 16, 35 e 36). Tais dentes foram selecionados por serem dentes posteriores e não apresentarem interferência com a estética, tendo assim, melhor aceitação por parte dos voluntários. Além disso, a redução do número de dentes examinados possibilitou a realização adequada de repetidos exames clínicos, de forma mais rápida e com menor custo. Porém, deve-se considerar que o uso de dentes específicos pode gerar vieses, devido à ampla variação do acúmulo de placa

e sangramento gengival em diferentes regiões da dentição. A utilização de um delineamento que excluí a ação mecânica contribuiu para minimizar possíveis vieses de se utilizar registros parciais (Salgado et al.⁸⁵ 2006, Deinzer et al.⁸⁶ 2007).

Uso do gel de malva a 10% foi baseado na literatura específica da área de fitoterapia, a qual estabelece uma concentração usual entre 2 a 10 % (m/m) para produtos extrativos a partir de *Malva sylvestris* L. (Alonso³⁹ 1998, Bezerra, Rebello⁸⁷ 2001, Lima⁸⁸ 2008). Com o objetivo de obter um efeito máximo a partir da espécie vegetal, foi adotada a concentração de 10 % para o desenvolvimento de estudo clínico.

Os agentes foram manipulados em gel aquoso de hidroxietilcelulose a 3 % (m/m). Considerando que o extrato hidroalcoólico bruto de malva revela uma composição fitoquímica complexa, e que o digluconato de clorexidina apresenta características catiônicas, a hidroxietilcelulose (Natrosol®, PharmaSpecial® – São Paulo – Brasil) foi selecionada para a elaboração das formas farmacêuticas, uma vez que se trata de um polímero celulósico não iônico, compatível com ambas as substâncias ativas mencionadas. O flavorizante (cereja) que foi utilizado com a finalidade de mascarar o sabor das preparações, não possuía qualquer atividade antimicrobiana e/ou anti-inflamatória (Appel, Reus⁵⁹ 2005, Ferreira, Brandão⁸⁹ 2008).

Os resultados mostraram que o índice de placa final foi semelhante entre os grupos tratados com malva e placebo. O grupo tratado com clorexidina apresentou os menores valores. Inúmeros estudos demonstraram a eficácia da clorexidina na redução e formação do biofilme dental, sendo um antimicrobiano de amplo espectro com alto poder desinfetante, sendo por isso utilizado como controle positivo (Herrera et al.²⁰2007, Marinho, Araújo⁹⁰ 2007, Asokan et al.⁹¹2009).

O grupo gel do EHBM 10% não demonstrou diferenças estatísticas no exame final do índice de placa quando comparado ao grupo placebo, não sendo possível observar atividade antimicrobiana da malva. Devido à falta de ensaios clínicos com o objetivo de investigar o efeito de *M. sylvestris* sobre o biofilme dental e inflamação gengival, os dados deste estudo clínico foram avaliados por meio de inferências a estudos in vitro, apesar destes estudos não reproduzirem exatamente as condições bucais. O ensaio da atividade antimicrobiana in vitro realizado nesta pesquisa e os estudos de Souza et al.⁴³ (2004) e Bonjar⁸¹ (2004) demonstraram esta pequena atividade antibacteriana de malva.

Analisando-se os valores do índice de sangramento marginal, os resultados foram semelhantes entre os grupos, sem diferenças significativas. Porém, o grupo que utilizou malva teve uma tendência à baixos valores em comparação com placebo. Essa observação vai ao encontro de outros estudos da literatura que mostram propriedades anti-inflamatórias da planta (Bruneton⁷¹ 1991, Alonso³⁹ 1998, Lorenzi, Abreu Matos⁸ 2008).

A análise da quantidade do fluido gengival absorvido nas tiras não mostrou diferenças entre os grupos, resultado que confirma os achados clínicos. Para se estimar o volume coletado, foi utilizado o método colorimétrico com ninhidrina 0,2% em solução alcoólica, medindo a área de absorção do fluído em mm². Apesar de haver métodos mais sofisticados (eletrônico) para análise do fluído gengival, Suppipat, Suppipat⁹² (1977), compararam os métodos para a obtenção do volume do fluido quando coletado através de tiras de papel absorventes e dispositivos eletrônicos. Os resultados mostraram uma relação linear entre as duas técnicas, concluindo que ambos são eficazes na quantificação das amostras.

Alguns aspectos devem ser considerados na interpretação dos dados obtidos. A sistematização dos procedimentos, segundo a sequência pré-determinada pelos pesquisadores, poderia melhorar o entendimento do voluntário no transcorrer da pesquisa. Porém, por outro lado, pode também ter ocorrido um entusiasmo nas primeiras fases e desmotivação nas fases finais. O efeito “Hawthorne” (Van der Weijden, Hioe¹⁷ 2005) também pode ter tido algum tipo de influência. Este fenômeno refere-se ao fato do voluntário melhorar suas atitudes, pelo simples fato de ter conhecimento que está participando de um estudo, e de alguma forma estar sob qualquer tipo de avaliação. Apesar dos voluntários terem sido orientados a sempre utilizarem a moldeira parcial para excluir a ação mecânica da escova, é possível que devido o conhecimento prévio do horário de retorno, alguns voluntários deliberadamente poderiam ter utilizado a escova. Essa suspeita ocorreu, pois mesmo após a exclusão da ação mecânica, os parâmetros clínicos permaneceram baixos em todos os grupos. O modelo de estudo cruzado pode ter contribuído para minimizar o efeito destas e outras variáveis não controláveis (Salgado et al.⁸⁵ 2006).

A seleção de estudantes universitários neste presente estudo, poderia ter influenciado os resultados, visto que os mesmos apresentavam boa condição de saúde bucal inicial, com baixo índice de placa e ausência de gengivite pré-existente. Os resultados poderiam ser diferentes se tivessem sido incluídos indivíduos com

doença periodontal. Outro aspecto importante que pode ter tido influência principalmente na inflamação gengival foi o período experimental utilizado (15 dias). Esse tempo é adequado para estudos que analisam a formação de biofilme dental (Kinane¹² 2001, Bernimoulin¹⁰ 2003, Kolenbrander et al.⁹³ 2006). No entanto, para a indução da inflamação gengival, esse período poderia não ter sido suficiente (Løe et al.⁹⁴ 1965, Nogueira Filho⁶⁴ 2000, Yates et al.⁹⁵ 2003).

Não foram observados efeitos adversos nos tecidos moles e/ou manchamento nos dentes com o uso dos agentes utilizados. Portanto, o uso de malva se mostrou seguro sem causar irritação aos tecidos.

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia empregada, pode-se concluir que:

- o extrato hidroalcoólico bruto de malva apresentou em sua composição mucilagens (metabólito primário), compostos fenólicos, cumarinas, antraquinonas, esteróides/triterpenos (metabólitos secundários), sugerindo o efeito anti-inflamatório de *M. sylvestris* L.;
- o extrato hidroalcoólico bruto de malva não apresentou atividade antimicrobiana;
- o extrato hidroalcoólico bruto de malva possui uma reduzida atividade antioxidante;
- O gel contendo o extrato hidroalcoólico de malva 10% não influenciou a formação de biofilme dental supragengival em comparação com o placebo e clorexidina;
- O gel contendo o extrato hidroalcoólico de malva 10% não influenciou a inflamação gengival em comparação com o placebo e clorexidina.

REFERÊNCIAS*

- 1 Baehni PC, Takeuchi Y. Review article Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. Oral Dis. 2003;9 Suppl1:23-9.
- 2 Axelsson P, Nystrom B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults. Results after 30 years of maintenance. J Clin Periodontol. 2004 Sep;31(9):749-57.
- 3 Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. J Clin Periodontol. 2004 Apr;31(4):229-38.
- 4 Ciancio S. Improving oral health: current considerations. J Clin Periodontol. 2003 Jan;30(1):4-6.
- 5 Davies RM. Toothpaste in the control of plaque/gingivitis and periodontitis. Periodontol 2000. 2008 Oct;48(1):23-30.
- 6 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Tradicional medicine strategy 2002 -2005 [acesso em 2009 Aug 2 12h37min]. Disponível em [http://worldebookfair.org/Members.3/World Health Collection/hq/2002/WHO E DM TRM 2002.1.pdf](http://worldebookfair.org/Members.3/World_Health_Collection/hq/2002/WHO_EDM_TRM_2002.1.pdf).
- 7 Medeiros, MT; Fonseca, VS; Andreato, RHP. Plantas medicinais e seus usos pelos sítiantes da Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba. Acta Bot. Bras. 2004;18(2): 391-9.
- 8 Lorenzi H, Abreu Matos FJ. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2008.
- 9 Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases:introduction. Periodontol 2000. 2005 Jun;38(1):9-12.
- 10 Bernimoulin JP. Recent concepts in plaque formation. J Clin Periodontol. 2003 Jun;30(5):7-9.
- 11 Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann Periodontol. 1999 Dec;4(1):1-6.

* De acordo com a norma do Programa de Mestrado em Odontologia da UEPG, baseada no modelo Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

- 12 Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2001 Feb;25(1):8-20.
- 13 Preshaw PM. Host response modulation in periodontics. *Periodontol 2000*. 2008 Oct;48(1):92-110.
- 14 Goodson JM. Gingival crevice fluid flow. *Periodontol 2000*. 2003 Feb;31(1):43-
- 15 Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Host-mediated resolution of inflammation in periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 2006 Feb;40(1):144-63.
- 16 Delima AJ, Van Dyke TE. Origin and function of the cellular components in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000*. 2003 Feb;31(1):55-76.
- 17 Van der Weijden, Hioe KPK. A systematic review of the effectiveness of self-performed mechanical plaque removal in adults with gingivitis using a manual toothbrush. *J Clin Periodontol*. 2005 Oct;32 Suppl 6:214-28.
- 18 Albert-Kiszely A, Pjetursson BE, Salvi GE, Witt J, Hamilton A, Persson GR, Lang NP. Comparison of the effects of cetylpyridinium chloride with an essential oil mouth rinse on dental plaque and gingivitis: a six month randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2007 Aug;34(8):658-67.
- 19 Moran JM. Home-use oral hygiene products:mouthrinses. *Periodontol 2000*. 2008 Oct;48(1):42-53.
- 20 Herrera BS, Mendes GIAC, Porto RM, Rigato HM, Moreira LD, Muscará MN, Magalhães JCA, Mendes GD. O papel da clorexidina no tratamento de pacientes com gengivite no distrito de São Carlos do Jamari RO. *Periodontia 2000*. 2007 dez; 7(4):60-4.
- 21 Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quím. Nova*. 1998 jan;21(1):99-105.
- 22 Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev.Bras Farm*. 2008 abr-jun;18(2):314-9.

- 23 Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA) - Resolução RDC nº. 48, de 16 de março de 2004 [acesso em 02 de agosto 2009 18h12min]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>.
- 24 ABIFISA. Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e Promoção à Saúde. [acesso em 02 de agosto 2009 19h10min] Disponível em: <http://www.abifisa.org.br>.
- 25 Billeter, M., Meier, B., Sticher, O. 8-Hydroxyflavonoid glucosides from *Malva sylvestris*. J Phytochem. 1990;8: 464–9.
- 26 Redzic S, Hodzic N, Tuka M. Plant pigments (antioxidants) of medicinal plants *Malva silvestris* L. and *Malva moschata* L. (Malvaceae). Bosn J Basic Med Sci. 2005 May;5(2):53-8.
- 27 Lima Júnior JF, Vieira LB, Leite MJVF, Lima KC. O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. Saúde Rev. 2005;7(16):11-7.
- 28 Oliveira FQO, Gobira B, Guimarães C, Batista J, Barreto M, Souza M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Rev Bras Farmacogn. 2007 jul-set;17(3):466-76.
- 29 Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. Phytother Res. 2003 Jun;17(6):599-604.
- 30 Drumond MRS, Castro RD, Almeida RVD, Pereira MSV, Padilha WWN. Estudo comparativo in vitro da atividade antibacteriana de produtos fitoterápicos sobre bactérias cariogênicas. Pesqui Bras Odontoped Clin Integr. 2004 jan-abr; 4(1):33-8.
- 31 Pereira JV, Pereira MSV, Higino JS, Sampaio FC, Alves PM, Araújo CRF. Estudos com o extrato da *Punica granatum* L (romã): efeito antimicrobiano in vitro e avaliação clínica de um dentífrico sobre microrganismos do biofilme dental. Rev Odonto Cienc. 2005 jul-set;20(49):262-9.
- 32 Soares DGS, Oliveira CB, Leal C, Drumond MRS, Padilha WWN. Susceptibilidade in vitro de bactérias bucais a tinturas fitoterápicas. Rev Odonto Cienc. 2006 jul-set;21(53):232-7.

- 33 Silva NB, Claudino LV, Neves AS, Costa AC, Valença ANG. Avaliação da atividade antimicrobiana de tinturas fitoterápicas sobre *Porphyromonas gingivales* e *Prevotella melaninogenica*. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2006 mai-ago;6(2):167-71.
- 34 Soares DGS, Oliveira CB, Leal C, Drumond MRS, Padilha WWN. Atividade antibacteriana in vitro da tintura de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) na descontaminação de escovas dentais contaminadas pelo *S. mutans*. Pesq Bras Odontoped Clin Integr. 2007 set-dez;7(3):253-7.
- 35 Zanin SMW, Miguel MD, Barreira SMW, Nakashima T, Cury CD, Costa CK. Enxaguatório bucal: princípios ativos e desenvolvimento de fórmula contendo extrato hidroalcoólico de *Salvia officinalis* L. Visão Acad. 2007 jun;8(1):19-24.
- 36 Lima Junior JF; Dimenstein M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: visão do odontólogo. Saúde Rev. 8:19, 37-44, 2006.
- 37 Hiçsonmez U, Erees FS, Ozdemir A, Ozdemir SC. Determination of major and minor elements in the *Malva sylvestris* L. from Turkey using ICP-OES techniques. Biol Trace Elem Res. 2009 Jan; 128(1):248–57.
- 38 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; 14:203-11.
- 39 Alonso JR. Tratado de Fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones,1998.
- 40 Cutillo F, D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Zarrelli A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva sylvestris*. Phytochemistry. 2006 Mar;67(5):481-5.
- 41 Chiclana CF, Enrique A, Consolini AE. Actividad Antiinflamatoria Local de *Malva sylvestris* L.(Malvaceae) en el Edema Inducido por Carragenina en Ratas. Lat Am J Pharm. 2009 abr-jun; 28 (2): 275-8.
- 42 Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D, Tubaro A, Menichini F, Loggia RD. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. J Ethnopharmacol. 2008 Feb 28;116(1):144-51.

- 43 Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. J Ethnopharmacol. 2004 Jan;90(1):135-43.
- 44 Jeambey Z, Johns T, Talhouk S, Batal M. Perceived health and medicinal properties of six species of wild edible plants in north-east Lebanon. Public Health Nutr. 2009 Oct;12(10):1902-11.
- 45 Malva. Espécie vegetal *Malva sylvestris* [acesso em 30 de julho 2009, 15h25min]. Disponível em <http://media.photobucket.com/image/malva>.
- 46 Farmacopéia Brasileira. 4^a ed. São Paulo: Atheneu, 2000. Parte II.
- 47 WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO 1998). Quality control methods for medicinal plant material [acesso em 02 de agosto 2009, 19h05min]. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/1998/9241545100.pdf>
- 48 Falkenberg MB, Santos RI, Simões CMO. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões CMO, Schenkel EP, Grosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editores. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^a ed. Florianópolis: UFSC; 2004. p. 229-245.
- 49 Simões CMO, Schenkel EP, Grosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5^a ed. Florianópolis: UFSC, 2004.
- 50 Farnsworth NR. Biological and phytochemical screening of plants. J Pharm Sci. 1966 Mar;55(3):225-76.
- 51 Evans WC. Farmacognosia Trease y Evans. México: Interamericana McGraw-Hill, 1989.
- 52 Harborne JB. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis. 3rd edition. London: Chapman & Hall Pub, 1998.
- 53 Judice MAM. Determinação de componentes extracelulares de iodos ativados. [dissertação]. São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, USP – SP; 1991.
- 54 Strickland JDH, Parsons TR. A Practical Handbook of Seawater Analysis. 2nd Canada: Fish. Res. Board; 1972.

- 55 Rumbaoa RGO, Cornago DF, Geronimo IM. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chemistry* 2009;113:1133-8.
- 56 Osório AC, Martins JLS. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. *Rev. Bras. Cienc. Farm* 2004 out-dez;40(4):481-6.
- 57 Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999 May 1;269(2):337-41.
- 58 Ostrosky EA, Mizumoto MK, Lima MEL, Kaneko TM, Nishikawa SO, Freitas BR. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacog.* 2008 abr-jun;18(2):301-7.
- 59 Appel G, Réus M. Formulações aplicadas à odontologia. 2ª ed. São Paulo:RCN, 2005.
- 60 Thompson, J.E. A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos. Porto Alegre: Artmed,2006.
- 61 Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Parte I.
- 62 Laufer Neto J, Jansen JL, Farago PV, Santos FA. Avaliação físico-química e microbiológica de gel termosensível à base de lidocaína e prilocaína para anestesia periodontal. *Arq. Odontol.* 2006 jul-set; 42(3):229-40.
- 63 Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- 64 Nogueira Filho GR, Toledo S, Cury JA. Effect of 3 dentifrices containing triclosan and various additives. An experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol.* 2000 Jul; 27(7):494-8.
- 65 Pannuti CM, Mattos JP, Ranoya PN, Jesus AM, Lotufo RFM, Romito GA. Clinical effect of a herbal dentifrice on the control of plaque and gingivitis. A double-blind study. *Pesqui Odontol Bras* 2003;17(4):314-8.

- 66 Silness J, L  e H. Peridontal disease in pregnancy. II Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta odontol scand* 1964; 22:121-35.
- 67 Mombelli A, van Oosten MA, Schurch E Jr, Land NP. The microbiota associated with successful or failing osseointegrated titanium implants. *Oral Microbiol Immunol*. 1987 Dec;2(4):145-51.
- 68 Van der Weijden GA, Timmerman MF, Nijboer A, Reijerse E, Van der Velden U. Comparison of different approaches to assess bleeding on probing as indicators of gingivitis. *J Clin Periodontol*. 1994 Oct;21(9):589-94.
- 69 Chioca LR, Chaim OM, Veiga SS, Pillati GL, Santos FA. Análise do volume e de glicoproteínas presentes no fluido gengival como um indicador de inflamação gengival. *Periodontia*. 2005 jul-set;15(3):59-64.
- 70 Samy RP, Gopalakrishnakone P. Review: Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 Jun 24.
- 71 Bruneton J. Elementos de fitoquímica y de farmacognosia. Zaragoza: Editorial Acribia,1991.
- 72 Santos SC, Mello JCP. Taninos. In: Simões CMO, Schenkel EP, Grosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5   ed. Florianópolis: UFSC; 2004. p. 623-641.
- 73 Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999 Oct;12(4):564-82.
- 74 Zuanazzi JAS, Montanha JA. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Grosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6   ed. Florianópolis: UFSC; 2007. p. 577-614.
- 75 Kuster RM, Rocha LM. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Grosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR, editores. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5   ed. Florianópolis: UFSC; 2004. p. 537-551.
- 76 Schulz V, Hansel R, Tyler VE. *Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*. 4   ed. São Paulo: Manole, 2002.

- 77 Asolini FC, Tedesco AM, Carpes ST. Atividade antioxidante e antibacteriana e compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Braz J Food Technol.* 2006 jul-set;9(3):209-15.
- 78 Lima AR, Barbosa VC, Santos Filho PR, Gouvêa CMCP. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Rev Bras Farmacog.* 2006 out-dez; 16(4):531-6.
- 79 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 ;108(1):31-7.
- 80 Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Cândida*. *RSBMT* 2009 mar-abr;42(2):222-4.
- 81 Bonjar S. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. *J Ethnopharmacol.* 2004 Oct;94(2-3):301-5.
- 82 Baumgartner S, Imfeld T, Schicht O, Rath C, Persson RE, Persson GR The impact of the stone age diet on gingival conditions in the absence of oral hygiene. *J Periodontol.* 2009 May;80(5):759-68.
- 83 Schiffner U, Bahr M, Effenberger S. Plaque and gingivitis in the elderly: a randomized, single-blind clinical trial on the outcome of intensified mechanical or antibacterial oral hygiene measures. *J Clin Periodontol.* 2007 Dec;34(12):1068-73.
- 84 Trombelli L, Farina R, Minenna L, Carrieri A, Scapoli C, Tatakis DN. Experimental gingivitis: reproducibility of plaque accumulation and gingival inflammation parameters in selected populations during a repeat trial. *J Clin Periodontol.* 2008 Nov;35(11):955-60.
- 85 Salgado ADY, Maia JL, Pereira SLS, Lemos TLG, Mota OML. Antiplaque and antigingivitis effects of a gelcontaining punica granatum linn extract. a double-blind clinical study in humans. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(3):162-6.
- 86 Deinzer R, Weik U, Kolb-Bachofen V, Herforth A. Comparison of experimental gingivitis with persistent gingivitis: differences in clinical parameters and cytokine concentrations. *J Periodontal Res.* 2007 Aug;42(4):318-24.

- 87 Bezerra SV, Rebello T. Guia de produtos cosméticos. 3ª ed. São Paulo: Editora SENAC São Paulo, 2001.
- 88 Lima A. Índice terapêutico fitoterápico - Ervas medicinais. Petrópolis: EPUB, 2008.
- 89 Ferreira AO, Brandão M. Guia prático de farmácia magistral. 3ª ed. São Paulo:Pharmabooks,2008.
- 90 Marinho BVS, Araújo ACS. O uso de enxaguatórios bucais sobre a gengivite e o biofilme dental. Int J Dent Recife. 2007 out- dez;6(4):124-31.
- 91 Asokan S, Emmadi P, Chamundeswari R. Effect of oil pulling on plaque induced gingivitis: a randomized, controlled, triple-blind study. Indian J Dent Res. 2009 Jan-Mar;20(1):47-51.
- 92 Suppipat N, Suppipat N. Evaluation of an electronic device for gingival fluid quantification. J Periodontol. 1977 Jul;48(7):388-94.
- 93 Kolembrander PE, Palmer Jr RJ, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI, Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. Periodontol 2000. 2006 Oct;42(1):47-79.
- 94 Loe H, Theilade E, Jensen BS. Experimental gingivitis in man. J Periodontol 1965;36:177-87.
- 95 Yates RJ, Shearer BH, Morgan R, Addy M. A modification to the experimental gingivitis protocol to compare the antiplaque properties of two toothpastes. J Clin Periodontol. 2003 Feb;30(2):119-24.

APÊNDICE A – Modelo ficha clínica e coleta de dados

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA – CURSO DE ODONTOLOGIA										
DISCIPLINA DE PERIODONTIA								Nº: _____		
Nome: _____								Sexo: _____		
Endereço: _____										
Cidade: _____				U.F.: _____		CEP: _____		Fone: _____		
Data de Nascimento _____				Idade: _____		Estado civil _____		Profissão: _____		
ANAMNESE - HISTÓRICO						DATA: / / .		SIM	NÃO	
1.	Está ou esteve em tratamento médico nos últimos 6 meses?									
2.	Faz ou fez uso contínuo de algum medicamento nos últimos 6 meses?									
3.	Quais? _____									
4.	Algum tipo de alergia?									
5.	Quais? _____									
6.	Alguma doença sistêmica?									
7.	Quais _____									
8.	Hipertensão?									
9.	Grávida?									
10.	Usa anticoncepcionais?									
11.	Fumante?									
12.	Fez algum tratamento Odontológico nos últimos 6 meses?									
13.	Motivo? _____									
14.	N. de vezes que escova os dentes por dia?				1 ()	2 ()	3 ()	4 ()	5 ()	+ de 5 ()
15.	Tipo de escova?				Dura ()		Média ()		Macia ()	
16.	Técnica de escovação?		Horizontal ()		Bass ()		Stillman ()		Fones ()	Outra ()
17.	Usa o fio dental?									
18.	N. de vezes que usa o fio dental por dia?				Nenhuma ()	As vezes ()	1 ()	2 ()	3 ()	4 ()
19.	Usa creme dental?									
20.	Usa alguma solução para bochecho?									
21.	Qual? _____									
22.	Usa algum outro meio auxiliar para higienização bucal									
23.	Quais? _____									
OBSERVAÇÕES:										

PRIMEIRA ETAPA

I	F	Índice de Placa – / /								Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27		
IPL.	V										
	L										
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37		
IPL.	V										
	L										

I	F	Índice de Gengival – / /								Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27		
IPL.	V										
	L										
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37		
IPL.	V										
	L										

I	F	Coleta de Fluido – / /								Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27		
IPL.	V										
	L										
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37		
IPL.	V										
	L										

I	F	Coleta de Biofilme – / /								Tratamento:	
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27		
IPL.	V										
	L										
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37		
IPL.	V										
	L										

SEGUNDA ETAPA

I	F	Índice de Placa – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Índice de Placa – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

TERCEIRA ETAPA

I	F	Índice de Placa – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Índice de Placa – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Índice de Gengival – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Fluido – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

I	F	Coleta de Biofilme – / /					Tratamento:		
DENTE		17	16	15	14	24	25	26	27
IPL	V								
	L								
DENTE		47	46	45	44	34	35	36	37
IPL	V								
	L								

DATA	PROCEDIMENTO OPERATÓRIO

APÊNDICE B – Planilhas com os dados descritivos da análise estatística

Planilha resultados do teste de normalidade dos dados para o índice de placa (IPL) e índice de sangramento marginal (IG) dos grupos Placebo (P), Malva (M) e Clorexidina (C)

	Paciente	IPL1-MP	IG1-MP	IPL2-MP	IG2-MP	IPL1-MM	IG1-MM	IPL2-MM	IG2-MM	IPL1-MC	IG1-MC	IPL2-MC	IG2-MC
Number of values	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Minimum	1,000	0,0	0,0	0,4400	0,0	0,1300	0,0	0,5600	0,0	0,0	0,0	0,2500	0,0
25% Percentile	6,500	0,2800	0,0	0,8450	0,0	0,2800	0,0	0,6300	0,0	0,2200	0,0	0,5650	0,0
Median	19,00	0,3800	0,0	1,000	0,1300	0,3800	0,0600	0,8800	0,0600	0,3800	0,0600	0,6900	0,0
75% Percentile	27,50	0,5000	0,1300	1,160	0,2800	0,5000	0,2200	1,125	0,1600	0,5950	0,2500	0,8450	0,1600
Maximum	37,00	1,190	1,130	1,880	1,690	0,7500	0,6300	1,380	0,4400	0,9400	0,6300	1,630	0,9400
Mean	18,16	0,4568	0,1252	1,034	0,2116	0,3960	0,1460	0,8900	0,1032	0,3948	0,1508	0,7724	0,1276
Std. Deviation	11,35	0,2570	0,2578	0,3238	0,3635	0,1623	0,1741	0,2759	0,1222	0,2475	0,1815	0,3472	0,2309
Std. Error	2,269	0,05141	0,05157	0,06476	0,07269	0,03246	0,03482	0,05518	0,02443	0,04951	0,03629	0,06944	0,04618
Lower 95% CI of mean	13,48	0,3507	0,01877	0,9007	0,06157	0,3290	0,07413	0,7761	0,05278	0,2926	0,07589	0,6291	0,03229
Upper 95% CI of mean	22,84	0,5629	0,2316	1,168	0,3616	0,4630	0,2179	1,004	0,1536	0,4970	0,2257	0,9157	0,2229
KS normality test													
KS distance	0,1173	0,2733	0,3198	0,1823	0,2802	0,1408	0,2093	0,2270	0,2382	0,1238	0,2370	0,2457	0,2951
P value	P > 0.10	P<0.0001	P<0.0001	0,0316	P<0.0001	P > 0.10	0,0062	0,0018	0,0008	P > 0.10	0,0009	0,0004	P<0.0001
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No	No	No	Yes	No	No	No	Yes	No	No	No
P value summary	ns	***	***	*	***	ns	**	**	***	ns	***	***	***
D'Agostino & Pearson omnibus normality test													
K2	5,469	11,31	36,00	4,018	38,96	1,212	8,506	4,858	10,27	0,8697	5,841	5,200	26,31
P value	0,0649	0,0035	P<0.0001	0,1341	P<0.0001	0,5456	0,0142	0,0881	0,0059	0,6474	0,0539	0,0743	P<0.0001
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No	Yes	No	Yes	No	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No
P value summary	ns	**	***	ns	***	ns	*	ns	**	ns	ns	ns	***

Planilha com os dados do índice de placa (IPL) e índice de sangramento marginal (IG) dos grupos Placebo (P), Malva (M) e Clorexidina (C)

Paciente	IPL1-MP	IG1-MP	IPL2-MP	IG2-MP	IPL1-MM	IG1-MM	IPL2-MM	IG2-MM	IPL1-MC	IG1-MC	IPL2-MC	IG2-MC
1	0,44	0,13	1,00	0,38	0,50	0,44	1,19	0,19	0,63	0,25	1,38	0,31
2	0,25	0,00	0,94	0,00	0,25	0,00	0,56	0,06	0,13	0,00	0,38	0,00
3	1,19	1,13	1,88	1,69	0,75	0,31	1,38	0,44	0,69	0,25	1,38	0,94
4	0,50	0,19	1,38	0,00	0,75	0,06	1,38	0,00	0,94	0,06	1,63	0,00
5	0,25	0,06	0,44	0,31	0,38	0,44	0,63	0,25	0,38	0,25	0,63	0,25
6	0,75	0,50	0,69	0,06	0,50	0,06	0,75	0,06	0,25	0,13	0,44	0,13
7	0,88	0,00	1,00	0,00	0,31	0,63	1,25	0,00	0,25	0,00	0,63	0,00
8	1,00	0,56	1,56	0,44	0,50	0,19	1,31	0,00	0,69	0,63	1,25	0,56
9	0,38	0,00	0,94	0,13	0,25	0,06	0,63	0,06	0,25	0,00	0,63	0,00
10	0,38	0,06	0,94	0,13	0,13	0,00	1,00	0,00	0,13	0,00	0,81	0,00
11	0,25	0,00	1,56	0,63	0,31	0,13	0,63	0,13	0,56	0,50	0,88	0,19
12	0,00	0,00	1,00	0,00	0,50	0,19	1,00	0,25	0,00	0,00	0,63	0,00
13	0,38	0,00	1,13	0,19	0,13	0,00	0,63	0,00	0,38	0,13	0,75	0,00
14	0,25	0,00	1,00	0,00	0,19	0,00	1,06	0,06	0,25	0,00	0,75	0,00
15	0,25	0,00	0,69	0,00	0,38	0,13	0,88	0,38	0,44	0,31	0,75	0,00
16	0,50	0,06	0,94	0,13	0,25	0,00	0,63	0,19	0,00	0,00	0,50	0,00
17	0,44	0,00	1,13	0,19	0,56	0,00	0,63	0,13	0,38	0,00	0,75	0,13
18	0,38	0,00	0,75	0,00	0,38	0,00	0,63	0,00	0,19	0,00	0,44	0,06
19	0,38	0,13	0,94	0,00	0,31	0,19	0,88	0,00	0,13	0,38	0,63	0,06
20	0,31	0,06	1,06	0,00	0,38	0,06	1,06	0,00	0,50	0,00	0,69	0,06
21	0,38	0,00	0,69	0,13	0,50	0,25	0,88	0,06	0,38	0,19	0,44	0,50
22	0,50	0,00	0,94	0,63	0,50	0,38	0,56	0,13	0,38	0,38	0,25	0,00
23	0,50	0,00	1,19	0,00	0,31	0,00	0,88	0,00	0,75	0,06	0,69	0,00
24	0,44	0,00	0,69	0,00	0,38	0,00	0,63	0,06	0,44	0,00	0,75	0,00
25	0,44	0,25	1,38	0,25	0,50	0,13	1,19	0,13	0,75	0,25	1,25	0,00

Planilha resultados do teste de normalidade dos dados para o fluido gengival dos grupos Placebo (P), Malva (M) e Clorexidina (CLX)

	FP-1	FP-2	FM-1	FM-2	FCLX-1	FCLX-2
Number of values	25	25	25	25	25	25
Minimum	0,1800	0,3100	0,3400	0,2500	0,1800	0,3100
25% Percentile	0,5900	0,6600	0,5700	0,7450	0,5900	0,6600
Median	0,8200	0,8700	0,8700	0,8900	0,8200	0,8700
75% Percentile	1,275	1,335	1,270	1,265	1,275	1,335
Maximum	2,070	2,010	2,740	1,970	2,070	2,010
Mean	0,9284	0,9868	0,9860	1,006	0,9284	0,9868
Std. Deviation	0,4632	0,4514	0,5840	0,4169	0,4632	0,4514
Std. Error	0,09264	0,09029	0,1168	0,08337	0,09264	0,09029
Lower 95% CI of mean	0,7372	0,8005	0,7450	0,8335	0,7372	0,8005
Upper 95% CI of mean	1,120	1,173	1,227	1,178	1,120	1,173
KS normality test						
KS distance	0,1214	0,1535	0,1704	0,1292	0,1214	0,1535
P value	P > 0.10	P > 0.10	0,0591	P > 0.10	P > 0.10	P > 0.10
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	ns	ns	ns	ns
D'Agostino & Pearson omnibus normality test						
K2	2,320	2,178	11,04	1,808	2,320	2,178
P value	0,3135	0,3366	0,0040	0,4049	0,3135	0,3366
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	**	ns	ns	ns
Shapiro-Wilk normality test						
W	0,9570	0,9416	0,8759	0,9633	0,9570	0,9416
P value	0,3577	0,1613	0,0057	0,4845	0,3577	0,1613
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes
P value summary	ns	ns	**	ns	ns	ns
Summary	23,21	24,67	24,65	25,14	23,21	24,67

Planilha com os dados do fluido gengival dos grupos Placebo (P), Malva (M) e Clorexidina (CLX)

Paciente	FP-1	FP-2	FM-1	FM-2	FCLX-1	FCLX-2
1	1,04	1,58	0,89	0,87	1,04	1,58
2	2,07	1,32	0,34	1,15	2,07	1,32
3	1,34	0,80	2,74	1,97	1,34	0,80
4	0,96	0,87	1,24	1,00	0,96	0,87
5	0,44	0,73	1,00	1,47	0,44	0,73
6	0,82	1,48	1,86	1,16	0,82	1,48
7	1,69	2,01	0,55	0,89	1,69	2,01
8	0,18	0,78	1,92	1,73	0,18	0,78
9	0,69	1,02	0,98	1,44	0,69	1,02
10	0,59	0,85	0,87	1,08	0,59	0,85
11	1,52	1,72	0,35	0,52	1,52	1,72
12	1,47	1,35	0,59	0,66	1,47	1,35
13	0,29	0,61	0,89	0,81	0,29	0,61
14	0,59	0,31	0,84	1,67	0,59	0,31
15	0,71	0,74	1,43	0,61	0,71	0,74
16	1,21	0,93	0,62	0,77	1,21	0,93
17	0,57	0,46	1,06	0,85	0,57	0,46
18	0,93	0,42	0,52	0,77	0,93	0,42
19	0,59	0,88	0,67	0,72	0,59	0,88
20	1,48	1,31	0,45	0,25	1,48	1,31
21	0,51	0,98	0,59	0,77	0,51	0,98
22	1,06	1,68	1,30	1,08	1,06	1,68
23	0,82	0,52	0,86	1,03	0,82	0,52
24	0,69	0,68	0,35	0,50	0,69	0,68
25	0,95	0,64	1,74	1,37	0,95	0,64

ANEXO A - Parecer de aprovação COEP

: NIPI-UEPG

FAX : 32203263

02 SET. 2008 09:25 Pág. 1



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA



Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação



COEP

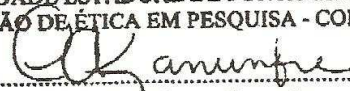
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº 20/2007
Protocolo: 07871/06

Em reunião extraordinária realizada nesta data, a Comissão de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa intitulado "**Estudo laboratorial e clínico dos efeitos da *Malva sylvestris* na resposta inflamatória, cicatrização e biofilme dental**" de responsabilidade do Pesquisador Fábio André dos Santos.

Ponta Grossa, 12 de abril de 2007.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP


Prof. Dr.ª Carla Cristine Kanunfre
Coordenadora