

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

ANA CRISTINA KOVALIK GONÇALVES

EFEITO DA *Malva sylvestris* L. NO REPARO DE LESÕES PALATINAS.
ESTUDO EM RATOS

PONTA GROSSA
2012

ANA CRISTINA KOVALIK GONÇALVES

**EFEITO DA *Malva sylvestris* L. NO REPARO DE LESÕES PALATINAS.
ESTUDO EM RATOS**

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

**PONTA GROSSA
2012**

Ficha catalográfica elaborada pelo Setor Tratamento da Informação BICEN/UEPG

G635e Gonçalves, Ana Cristina Kovalik
 Efeito da *Malva sylvestris* L. no reparo de lesões palatinas. Estudo
em ratos / Ana Cristina Kovalik Gonçalves. Ponta Grossa, 2012.
84 f.
 Dissertação (Mestrado em Odontologia – área de
concentração : Clínica Integrada), Universidade Estadual de Ponta
Grossa.
 Orientador : Prof. Dr. Fábio André dos Santos

1. Cicatrização. 2. *Malva sylvestris* L. 3. Fitoterapia.
I. Santos, Fábio André dos. II.T.

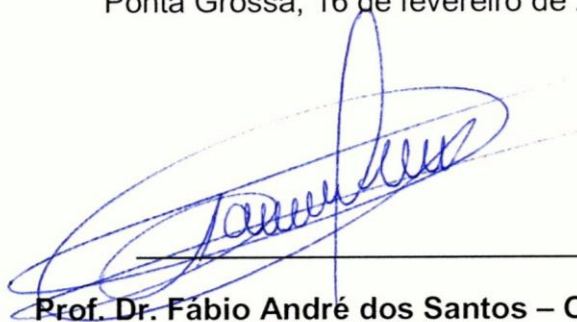
CDD : 617.6

ANA CRISTINA KOVALIK GONÇALVES

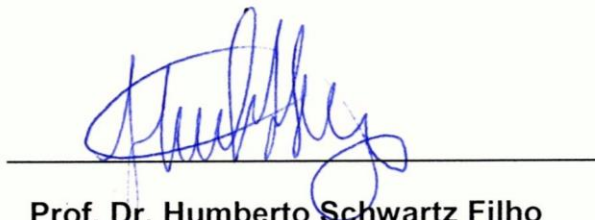
**EFEITO DA *MALVA SYLVESTRIS* L. NO REPARO DE LESÕES
PALATINAS. ESTUDO EM RATOS**

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.

Ponta Grossa, 16 de fevereiro de 2012.



Prof. Dr. Fábio André dos Santos – Orientador
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof. Dr. Humberto Schwartz Filho
Universidade Estadual de São Paulo



Prof. Dr. Leandro Eduardo Klüppel
Universidade Estadual de Ponta Grossa

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, a quem devo a minha existência,
à minha irmã Sueli e ao meu marido Elcio
e ao meu orientador Fábio André

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Nada acontece por acaso, por isso, e por vontade de forças superiores, agradeço hoje ao professor **Dr. Gibson Luiz Pilatti**, que um dia, em seu consultório, incentivou sua secretária e auxiliar a fazer vestibular para o curso de Odontologia, assim como estudar inglês, desenvolver projetos de iniciação científica e depois de concluir a graduação, participar do processo de seleção para o Mestrado. Obrigada professor e “ex-chefe” pelos conselhos, recomendações e exemplo de profissional a ser seguido.

E também através dele, fui privilegiada e tive o prazer de ser orientada pelo Professor **Dr. Fábio André dos Santos**, a quem devo toda minha evolução como aluna, pesquisadora e agora mestre, sempre baseado nos princípios éticos e morais, com persistência e determinação. Você não imagina o quanto “cresci” com seus ensinamentos e experiências, o que me permite dizer com muito orgulho que fui orientada pelo Fábio André. Espero ainda poder continuar neste longo caminho como sua seguidora. Serei eternamente grata por tudo que fez por mim!

Ao Elcio, meu marido, companheiro e amigo, por me incentivar a lutar por todos os meus sonhos e a ser uma pessoa cada vez melhor! Obrigada por me acompanhar nos experimentos durante os finais de semana e feriados e por compreender os momentos de ausência!

AGRADECIMENTOS

À Deus grande mestre e regente de nossas vidas.

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, pela concessão da bolsa de estudos para a realização deste Mestrado.

À coordenadora do PPGO Professora Dra. Osnara Maria Mongruel Gomes pelo comprometimento e dedicação dispensada ao programa. Agradeço pelo incentivo, carinho e motivação.

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

À Márcia Thaís Pochapski pelo exemplo de mulher e profissional, pesquisadora e amiga. Obrigada por me ouvir sempre (mesmo sob os pingos da chuva) e me aconselhar sabiamente.

Ao Professor Dr. Eduardo BaumL Campagnoli pelas ideias, orientações e incentivos.

À Morgana das Graças Procz dos Santos pela disposição em ajudar sempre, pela amizade e atenção.

À bibliotecária Eunice pela atenção e disposição em ajudar nas correções dessa dissertação.

À minha amiga-irmã Paula Bisetto que me acompanha desde a graduação e realizou a experimentação animal ao meu lado, pelo companheirismo, persistência e determinação.

À Letícia Antonelo Campos e Jeniffer Perussolo por me ajudar nos experimentos.

Aos funcionários do departamento de Odontologia e de toda a instituição que sempre me receberam com um sorriso nos lábios.

A todos os colegas do Mestrado, obrigada pela aprendizagem e troca de experiências.

Aos meus amigos do Mestrado Antonio Sakamoto, John Alexis Domingues, Bruna Benso, Luisa Rech Gomes Gregol, Elize Bonafé, Fabiane Schreiner, Bruna Bitencourt e Márcia Siqueira e Letícia Ferri, por compartilhar conhecimentos, momentos de tristeza e frustrações, mas principalmente de muita alegria. Agradeço sinceramente pela amizade, franqueza e companheirismo nestes dois anos.

Aos meus amigos estrangeiros John Alexis, Andrés Felipe, Issis, Alexandra, Yileng, Lucho, Miguel, Eugênio, Vivian e Ana Rita, agradeço pelo convívio que me permitiu enriquecer culturalmente e conhecer mais sobre a Colômbia, Venezuela, Equador, Peru, Chile, Argentina, Bolívia e Portugal.

Aos amigos de Doutorado Yasmine Mendes Pupo, Stella M. Glaci Reinke e Márcio Cristiano de Souza Rastelli pelas parcerias em projetos, amizade e incentivo para seguir adiante.

Aos meus tios Mário e Teresa Abe, Jorge e Yuka Abe, Massami e Toyoko Abe pelo incentivo à minha dedicação aos estudos desde à infância.

O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.

Thomas Huxley

DADOS CURRICULARES

Ana Cristina Kovalik Gonçalves

NASCIMENTO 22.02.1978	Ponta Grossa – Pr
FILIAÇÃO	Augusto Kovalik Yone Abe Kovalik
2004 – 2008	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual de Ponta Grossa
2008 – 2008	Curso de Aperfeiçoamento em Estratégia da Saúde da Família – ABO Regional Ponta Grossa
2009 – 2009	Curso de Aperfeiçoamento em Periodontia – Universidade Estadual de Ponta - UEPG
2010 – 2012	Curso de Pós-Graduação em Odontologia Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG, nível de Mestrado em Odontologia – Área de concentração em Clínica Integrada

RESUMO

KOVALIK, AC. Efeito da *Malva sylvestris* L. no reparo de lesões palatinas. Estudo em ratos. [Dissertação Mestrado em Clínica integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2012.

A fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas sem substâncias ativas isoladas. Estudos indicam que a Malva, planta da família das malváceas apresenta potencial antimicrobiano e antiinflamatório. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a ação cicatrizante da *Malva sylvestris* em feridas na mucosa palatina. Foram utilizados 136 ratos Wistar, 60 dias de idade, peso entre 270 e 300 g. Os animais foram divididos em 4 grupos: Grupo 1- Controle; Grupo 2- Veículo orabase (gelatina, pectina e carboximetilcelulose em partes iguais; Grupo 3- Clorexidina 2% em gel natrosol; Grupo 4- Malva 20% em orabase. Após anestesia uma ferida na mucosa palatina foi confeccionada com um bisturi circular com extremidade ativa de 4 mm de diâmetro. Após a incisão circular o tecido mucoso foi removido com um descolador de periósteo, deixando exposto o tecido ósseo. As substâncias foram aplicadas 2x/dia (50mg). O reparo das feridas foi analisada através da avaliação de fotos digitais padronizadas do palato, sendo realizadas medidas em mm² da área da ferida. Também foram realizados cortes histológicos para análise histomorfométrica da porcentagem de epitelização das margens epiteliais em relação à extensão palatina. Os períodos de avaliação foram de 0, 3, 7, 15 e 21 dias. Os dados foram analisados através de ANOVA e pós teste de Tukey com o nível de significância 5%. Os resultados mostraram um padrão similar de reparo da mucosa entre todos os grupos, sendo as diferenças não significativas ($p > 0,05$). De acordo com a metodologia empregada foi possível concluir que o extrato de *Malva sylvestris* L. não apresentou efeito na modulação do reparo de feridas na mucosa palatina de ratos.

Palavras-chave: Cicatrização. *Malva sylvestris* L.. Fitoterapia.

ABSTRACT

KOVALIK, AC. Effects of *Malva sylvestris* L. in palate wound healing. Study in rats. [Dissertação Mestrado em Clínica integrada]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2012.

Phytotherapy includes several herbal preparations and herbal final products which contain active substances or a combination of them with no synthetic compounds and/or isolated constituents. Some studies have indicated Malva, Malvaceae plant family has showed antimicrobial and anti-inflammatory potential. The aim of this present study was to assess the wound healing effect of *Malva sylvestris* L. on a palate mucosa wound. A hundred thirty-six rats (*Rattus norvegicus albinus* – Wistar), two month-old, weighing 270 to 300 g were used. After intraperitoneal anesthesia, a 4 mm-diameter excisional wound was made (central area of palatal mucosa), using a punch-out biopsy tool. Mucoperiosteal tissue was removed by sharp dissection exposing a circular area of uncovered bone. Eight animals were sacrificed immediately (baseline). The remaining rats were divided into 4 groups: Group 1- Sham, Group 2- Orabase Vehicle (gelatin, pectin and carboxymethylcellulose in equal parts), Group 3- 2% Chlorhexidine, Group 4- Orabase 20% Malva. The agents were applied twice a day (50 mg). Experimental periods were 3, 7, 15 and 21 days. The wound area was photographically measured (mm²) considering the distance between the epithelium margins. The data were analyzed by ANOVA and Tukey post-hoc test with a 5% significance level. The results showed a similar healing pattern among the groups, with no significant differences ($p>0.05$). According to the methodology it was concluded that *Malva sylvestris* L. extract had no effect on wound healing in palatal mucosa of rats.

Keywords: Wound healing. *Malva sylvestris* L.. Phytotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Folhas da <i>Malva sylvestris</i> L.....	33
Figura 2	- Flores da <i>Malva sylvestris</i> L.....	33
Figura 3	- Aplicação anestésica intraperitoneal.....	47
Figura 4	- Posicionamento do animal na mesa cirúrgica após anestesia....	47
Figura 5	- Palato íntegro (A); Confeção da lesão posteriormente à 2ª ruga palatina com “punch” de 4 mm (B); Delimitação da ferida pelo “punch”; remoção de mucosa palatina expondo o tecido ósseo (D).....	48
Figura 6	- Espátula de madeira adaptado para a padronização de 25mg de cada uma das substâncias (A); Aplicação da substância no dispositivo com o auxílio da espátula de plástico (B).....	49
Figura 7	- Visualização da lesão (A); Aplicação da Orabase (B); Substância sobre a lesão (C).....	49
Figura 8	- Visualização de lesão (A); Aplicação da Clorexidina 2% (B); Substância sobre a lesão (C).....	49
Figura 9	- Visualização de lesão (A); Aplicação da Malva 20% (B); Substância sobre a lesão (C).....	50
Figura 10	- Mensuração da área da lesão através do software Image Pro Plus 4.5®	51
Figura 11	- Mensuração da distância histológica entre as margens epiteliais através do software Image Pro Plus 4.5®	52
Figura 12	- Corte histológico da região palatina demonstrando tecido epitelial íntegro (H.E. 40x).....	61
Figura 13	- Epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado (H.E. 200x)....	62
Figura 14	- Camadas do epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado (H.E. 400x).....	62
Figura 15	- Período de 3 dias, G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 – Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).....	63
Figura 16	- Período de 7 dias, G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 –	

	Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).....	64
Figura 17	- Período de 15 dias, G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 - Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).....	65
Figura 18	- Período de 21 dias, G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 - Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).....	66

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	- Plantas medicinais com potencial de utilização para a cura de afecções bucais segundo Castilho et al. ⁷ (2007) e Groppo et al. ³⁶ (2008).....	27
Quadro 2	- Diferenças regionais da mucosa bucal.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	- Percentual de aumento de peso dos animais durante os diferentes períodos experimentais.....	54
Gráfico 2	- Reprodutividade intra-examinador dos dados da mensuração da medida da área da leão palatina (mm ²) obtidos em dois momentos com intervalo de 48 h.....	55
Gráfico 3	- Média e erro padrão dos valores da área das lesões palatinas dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 3 dias.....	55
Gráfico 4	- Média e erro padrão dos valores da área das lesões palatinas dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 7 dias.....	56
Gráfico 5	- Média e erro padrão dos valores da área das lesões palatinas dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 15 dias.....	56
Gráfico 6	- Média e erro padrão dos valores da área das lesões palatinas dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 21 dias.....	57
Gráfico 7	- Reprodutividade intra-examinador dos dados da distância entre as margens da lesão (%) obtidos em dois momentos com intervalo de 48 h.....	58
Gráfico 9	- Média e erro padrão dos valores da distância entre as margens da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 3 dias.....	58
Gráfico 9	- Média e erro padrão dos valores da distância entre as margens da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 7 dias.....	59
Gráfico 10	- Média e erro padrão dos valores da distância entre as margens da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 15 dias.....	59
Gráfico 11	- Média e erro padrão dos valores da distância entre as margens	

da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 21 dias.....	60
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

L.	Linn
SUS	Sistema Único de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
IN	Instrução normativa
DPPH	1,1-Diphenyl-2- aPicrylhydrazyl
NBT	Nitroblue Tetrazolium
TC	Tecido conjuntivo
TA	Tecido adiposo
GSMe	Glândulas salivares menores
GSuM	Glândulas submandibulares
GSuL	Glândulas sublinguais
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
PAF	Fator ativador de plaquetas
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
PF4	Fator de plaquetas 4
EGF	Fator de crescimento epidérmico
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
MMP	Metaloproteinases da matriz
H.E.	Hematoxilina e eosina
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (atual SBCAL)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-ácetico
ANOVA	Análise de Variância

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
h	Hora
°C	Graus Celsius
g	Grama
mL	Mililitro
°GL	Graus Gay-Lussac
m ⁻²	Metro a potência menos dois
µm	Micrometro
rpm	Rotação por minuto
®	Marca registrada
mg	Miligrama
mm	Milímetro
±	Mais ou Menos
<	Menor
>	Maior
α	Alfa
mm ²	Milímetro quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1	FITOTERÁPICOS NA ODONTOLOGIA.....	24
2.2	MALVA SYLVESTRIS L.....	30
2.3	LESÕES: MUCOSA BUCAL.....	33
2.4	TECIDO MUCOSO PALATINO.....	34
2.5	PROCESSO DE REPARO DA LESÃO.....	36
2.5.1	Hemostasia.....	37
2.5.2	Inflamação.....	37
2.5.3	Reparação.....	39
2.5.4	Persistência da resposta inflamatória.....	41
2.5.5	Contração da ferida e formação de cicatriz.....	41
3	PROPOSIÇÃO.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	44
4.2	EXTRATO BRUTO HIDROALCÓOLICO DA <i>Malva sylvestris</i> L.....	44
4.3	DESENVOLVIMENTO DAS FORMAS FARMACÊUTICAS.....	45
4.4	ANIMAIS.....	46
4.5	ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	50
4.6	ANÁLISE HISTOMÉTRICA.....	51
4.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA.....	52

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS.....	54
5.1	ANÁLISE MACROSCÓPICA.....	54
5.2	ANÁLISE HISTOMÉTRICA.....	57
5.3	ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA.....	60
6	DISCUSSÃO.....	67
7	CONCLUSÃO.....	72
	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA.....	82

1. INTRODUÇÃO

A fitoterapia é a modalidade terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, no entanto, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, cuja abordagem incentiva o desenvolvimento comunitário, a solidariedade e a participação social (World health organization¹ 2008, Barros et al.² 2012, Calixto³ 2000, Gasparetto et al.⁴ 2012).

O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e principalmente toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Isto acontece com a maioria das espécies vegetais consumidas pela população. A identificação correta destas espécies, sua forma de uso, posologia e controle de qualidade também constituem questões a serem resolvidas (Billeter et al.⁵ 1990, Redzic et al.⁶ 2005).

A malva (*Malva Sylvestris* L.) planta da família das malváceas, apresenta propriedades antiinflamatórias graças a substâncias como as mucilagens, antocianinas composto que também é anti-séptico e flavonóides. Bochechos com chá das folhas são utilizados para o tratamento de feridas na mucosa bucal (Gasparetto et al.⁴ 2012, Billeter et al.⁵ 1990, Castilho et al.⁷ 2007, Lima Junior e Dimenstein⁸ 2006).

Estudos para comprovar cientificamente a eficácia de fitoterápicos são necessários, pois além de estimular os pacientes e cirurgiões-dentistas a adotar plantas medicinais em seu esquema terapêutico, podem orientar a própria população sobre o uso adequado de tais substâncias, conhecendo seus efeitos reais, suas contra-indicações e seus riscos (World health organization¹ 2008, Calixto⁹ 2000, Franscico¹⁰ 2010).

O emprego de fitoterápicos só tem a contribuir para a saúde de quem o pratica, quando feito com critérios. Estes, por sua vez, referem-se à identificação do quadro clínico (doença ou sintoma), à escolha correta da planta a ser utilizada e à sua adequada preparação e desta forma ampliar o acesso a produtos e serviços aos usuários do SUS, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde.

O reparo ou a regeneração tecidual após procedimentos cirúrgicos intra-bucais representa uma etapa crítica para o paciente e para o profissional, pois a extensa e constante colonização por microrganismos. Em odontologia, a

prescrição de fitoterápicos para uso tópico após procedimentos cirúrgicos, visando reduzir a formação do biofilme dental e minimizar os impactos do trauma mecânico da mastigação, poderia assegurar ou acelerar a reparação tecidual. Por isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de reparo da *Malva sylvestris* em lesão palatina confeccionadas cirurgicamente em ratos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular. O reconhecimento de seu valor como recurso clínico, farmacêutico e econômico tem crescido progressivamente em vários países, os quais vêm normatizando e legislando acerca dos diferentes critérios de segurança, eficácia e qualidade que devem envolver esses produtos. Apesar do amplo uso dos agentes fitoterápicos, até hoje são escassos os estudos sobre as suas constituições químicas, atividades biológicas e mecanismo de ação (World health organization¹ 2008, Farnsworth et al.¹¹ 1985, Marchese et al.¹² 2004, Medeiros et al.¹³ 2004).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, demonstrando o potencial do país no desenvolvimento da fitoterapia, pois as plantas são importantes fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais são princípios para síntese de um grande número de fármacos como xarope de Melagrião, xarope de Guaco, Ginseng, Pasalix e Soyfit (repositor hormonal feminino). Segundo a ANVISA, há 36 medicamentos fitoterápicos de registro simplificado (BRASIL¹⁴ 2008) e a empresa farmacêutica Herbarium possui 40 tipos de medicamentos fitoterápicos disponíveis comercialmente (Herbarium¹⁵ 2012).

Pesquisadores da área de produtos naturais mostram-se impressionados pelo fato das plantas medicinais revelarem uma grande diversidade de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Lima Junior e Dimenstein⁸ 2006, Medeiros et al.¹³ 2004, Lorenzi e Abreu Matos¹⁶ 2008, Carvalho et al.¹⁷ 2008).

Para ser classificada como medicamento fitoterápico, a planta medicinal deverá passar por alguns critérios. O primeiro deles é a definição de fitoterápicos, em que um medicamento é assim considerado, apenas quando são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de drogas vegetais, como extrato, tintura, óleo, cera e suco. Uma planta medicinal ou suas partes constituintes jamais receberá registro como medicamento fitoterápico. Além disso, o fitoterápico deve ser seguro, ter seu efeito terapêutico comprovado e sua composição padronizada. Estudos técnico-científicos, pré-clínicos e clínicos deverão ser realizados previamente e seus resultados publicados para validar sua eficácia e segurança. A qualidade é determinada através do controle da matéria-prima, do produto acabado,

embalagem adequada, com formulação farmacêutica e estudos de estabilidade (BRASIL¹⁸ 2004, Ameh et al.¹⁹ 2010).

Desde 1978, a OMS incentiva os investimentos públicos em plantas medicinais, devido aos altos custos dos produtos sintéticos, o que estimulou a criação de leis para regularizar esta prática em 104 países (World health organization¹ 2008). A primeira iniciativa brasileira nesse sentido foi a criação da Central de Medicamentos (Ceme) em 1982 (extinta em 1991), que implantou um programa para pesquisar as plantas de uso popular existentes no Brasil, com o objetivo de obter possíveis substâncias ativas que servissem para o preparo de fitoterápicos. Em 2006 foi criado o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com o objetivo de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional” (BRASIL²⁰ 2007).

Quanto à legislação, em 16 de março de 2004 a ANVISA divulgou uma série de documentos que regulamentaram os medicamentos fitoterápicos no Brasil através da publicação da resolução RDC nº 48 (BRASIL²¹ 2004) “Registro de medicamentos fitoterápicos”, a RE nº 88 (BRASIL²² 2004) “Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia dos fitoterápicos”, RE nº 89 (BRASIL²³ 2004) “Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos”, a RE nº 90 (BRASIL²⁴ 2004) “Guia para a realização de estudos de Toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”, RE nº 91 (BRASIL²⁵ 2004) “Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de Fitoterápicos”. Em 22 de junho de 2006, o decreto nº 5.813 (BRASIL²⁶ 2006) aprova a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos”. Em 11 de dezembro de 2008 a Resolução RDC nº 95 (BRASIL²⁷ 2008) regulamentou o texto de Bula de medicamentos fitoterápicos e finalmente em 11 de dezembro de 2008 a Instrução normativa nº 5 (BRASIL²⁸ 2008) determinou a publicação de “Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro”.

Atualmente há 500 fitoterápicos registrados no Brasil. A ANVISA tem o papel de regulamentar todos os medicamentos, incluindo os fitoterápicos, além de fiscalizar as indústrias produtoras de medicamentos com o intuito de proteger e promover a saúde geral da população. O primeiro passo para comercializar um medicamento fitoterápico é a obtenção do registro dos derivados obtidos da matéria

prima ativa da planta junto à ANVISA (BRASIL²¹ 2004). Para isso é necessário que a empresa notifique previamente a produção de lotes-piloto de acordo com o "Guia para a notificação de lotes-piloto de medicamentos", publicado pela ANVISA na IN 06, de 18 de abril de 2007 (BRASIL²⁹ 2007). Posteriormente uma série de documentos deve ser anexada ao processo de solicitação do registro, incluindo relatório técnico, relatório de produção e controle de qualidade, relatório de eficácia e segurança.

Para justificar a aplicabilidade terapêutica da planta, um extenso levantamento bibliográfico deve também ser anexado ao processo, incluindo estudos etnofarmacológicos, técnico-científicos e ou publicações para avaliar indicações de uso episódico ou para curtos períodos de tempo; coerência em relação às indicações terapêutica propostas, possibilidade de toxicidade ou de grupos ou substâncias químicas tóxicas e comprovação de uso seguro por um período igual ou superior a 20 anos (Neto et al.³⁰ 2006, Carvalho et al.³¹ 2007).

Portanto, as solicitações de registro de medicamentos fitoterápicos passam por criteriosa análise técnica e geram o maior índice de indeferimentos de solicitações de registro da área de medicamentos na ANVISA: 43%. Esse valor é maior do que o praticado para medicamentos genéricos e similares (23,4%) e para medicamentos novos (13%), demonstrando a rigidez do controle na liberação desses medicamentos para a população (BRASIL³² 2010)

Prescrever fitoterápicos não é uma tarefa tão simples. Além dos dados mínimos e essenciais de uma receita, como nome do profissional, profissão e especialidade e número do registro de conselho de classe, também deverá constar o nome popular seguido do nome científico da planta, modo de preparo com quantidades específicas, posologia e tempo de uso, seguido de data, assinatura ou carimbo profissional, endereço e telefone do profissional. E o mais importante é o conhecimento do profissional acerca das indicações específicas dos fitoterápicos em sua área (Panizza³³ 2010).

2.1. FITOTERÁPICOS NA ODONTOLOGIA

Apesar de encontrarmos relatos na literatura de plantas medicinais utilizadas no tratamento de afecções bucais, tendo estas propriedades antiinflamatórias, antihemorrágicas, analgésicas e cicatrizantes, os fitoterápicos

praticamente não são os medicamentos de escolha nos serviços públicos e em consultórios particulares de atendimento odontológico. Dentre os motivos, além do pré-conceito, a falta de estudos clínicos que comprovem a eficácia e a segurança clínica desta modalidade terapêutica e o desconhecimento sobre o assunto por parte dos profissionais geram insegurança no momento da prescrição (Lima Junior e Dimenstein⁸ 2006, Franscico¹⁰ 2010, Oliveira et al.³⁴ 2007, Soyama³⁵ 2007),

Castilho et al.⁴ (2007) realizaram um levantamento das plantas medicinais com potencial uso odontológico em diversos países, identificando 44 diferentes plantas cujas pesquisas in vitro ou in vivo demonstraram ser efetivas contra cáries, doenças periodontais, candidíase ou estomatite (Quadro 1).

Outra revisão sobre as espécies indicadas para o tratamento de afecções odontológicas foi realizada por Oliveira et al.³⁰ 2007. Foram identificadas 132 espécies vegetais pertencentes a diferentes famílias em livros e artigos científicos. Dentre as plantas medicinais mais indicadas estão: romã (*Punica granatum* L.) com 10 citações, a malvavísco (*Althaea officinalis*) com 8 citações, Sálvia (*Salvia officinalis* L.) com 8 citações, calêndula (*Calendula officinalis* L.) com 8 citações, a malva (*Malva sylvestris* L.) com 7 citações e a tanchagem (*Plantago major* L.) com 6 citações. As formas farmacêuticas mais empregadas para a utilização destas plantas foram: decocto, infusão, gargarejo e chá. Em menor frequência foram citadas: emplastro, maceração, tintura e creme tópico. Porém, os autores concluem que apesar da utilização já difundida ainda faltam estudos científicos para comprovar sua eficácia em afecções odontológicas.

Foi realizado um levantamento de dados incluindo plantas medicinais com propriedades ansiolíticas e irrigantes endodônticos (Grosso et al.³⁶ 2008) além das propriedades acima citadas (Quadro 1). Estes autores destacam que são necessários estudos clínicos para assegurar a eficácia e a segurança, efeitos colaterais, toxicidade e interações entre as mesmas.

Dentre as plantas medicinais mais utilizadas por usuários do serviço público e privado odontológico de João Pessoa na Paraíba estão a romã (*Punica granatum* L.), óleos essenciais do cajueiro roxo (*Anacardium occidentale* L.) e do juá (*Zizyphus joazeiro*), da hortelã da folha graúda (*Plectrantus amboinicus* Lour) e aroeira (*Schinus terebinthifolius*), porém, somente um cirurgião dentista indicou o uso de plantas (Santos et al.³⁷ 2009).

Nome comum (nome científico)	Atividade	Doença	Autores, ano
(Macleya cordata)	Antiinflamatório	cárie, gengivite	Khalessi et al., 2005;
abacate (Persea americana)	previne efeitos IL-1	Periodontite	Kut-Lasserre et al., 2001;
açafrão (Curcuma xanthorrhiza Roxb.)	Antimicrobiano	Estomatite	Rukayadi et al., 2006;
alecrim-do-campo (Naccharis dracunculifolia)	Antimicrobiano	cárie e periodontite	Leitão et al. 2004; Tarakada et al. 2004;
alecrim-pimenta (Lippia sidoides Cham)	Antiinflamatório	Gengivite	Soukoulis et al., 2004;
alfazema (Lavandula officinalis)	Antimicrobiano	Periodontite	Tarakada et al., 2004;
alho (Allium sativum)	Antimicrobiano	cárie e periodontite	Elnima et al., 1983; Groppo et al. 2002; Bakri & Douglas
aloe vera (Asphodelaceae Juss)	Antimicrobiano, Antiinflamatório, Cicatrizante	periodontite, gengivite, afta, osteíte alveolar	Scherer et al., 1998; Kaim et al., 1998; Wynn, 2005;
amendoeira (Terminalia glauscescens)	Antimicrobiano	periodontite	Sote and Wilson, 1995; Taiwo et al., 1999;
anis-estrelado (Illicium verum Hook.)	Antimicrobiano	periodontite	Iauk , 2003;
arak (Salvadora pérsica)	Antimicrobiano e Antiinflamatório	cárie e gengivite	Al-lafi & Ababneh 1995; Almas, 2001; Almas, 2002; Almazaid 2004; Al-Otaibi et al., 2004; Khalessi et al. 2005;
arnica (Arnica montana L.)	Antimicrobiano	periodontite	Iauk , 2003;
bardana (Arctium lappa)	Antimicrobiano	medicação intracanal	Pereira et al., 2005; Gentil et al., 2006;
calêndula (Callendula officinalis L.)	Antimicrobiano Antiinflamatório	periodontite	Blumenthal et al., 2000; Shultz et al., 2002; Iauk ,2003; Sartori et al., 2003; Falcão et al., 2005;
camomila (Matricaria camomilla ou Matricaria recutita L.)	Antiinflamatório	gengivite, remoção da smear layer dos canais radiculares	Pannuti et al., 2003; Pistorius et al., 2003; Sadr-Lahyani et al., 2006; McKay & Blumberg, 2006;
canela-da-china (Cinnamomum cássia)	Antimicrobiano	candidíase	Giordani et al., 2006;
capim-cheiroso (Cymbopogon citratus)	Antimicrobiano	candidíase	Schuck et al., 2001;
casca do tem (Massularia acuminat)	Antimicrobiano	periodontite	Sote and Wilson, 1995; Taiwo et al., 1999;
cebola-de-cabeça (Allium cepa)	Antimicrobiano	cárie e periodontite	Kim, 1997;
centela (Centella asiatica)+ romã	Cicatrizante	periodontite	Sastravaha et al., 2005;
cidrão (Aloysia triphyll)	Antimicrobiano		Sartoratto et al., 2004 ;
cranberry	Antimicrobiano	cárie e periodontite	Koo et al., 2006;

Quadro 1. Plantas medicinais com potencial de utilização para a cura de afecções bucais.
 Fonte: Castilho et al.⁷ (2007) e Groppo et al.³⁶ (2008).

(continua)

cominho (<i>Carum carvi</i>)	Antimicrobiano	gingivite	Pannuti et al., 2003; Pistorius et al., 2003; 2003;
cravo (<i>Eugenia caryophyllus</i>)	Antimicrobiano	gingivite	Pistorius et al., 2003;
cravo-da índia (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Antimicrobiano	periodontite e candidíase	Feres et al., 2005; Taguchi et al., 2005; Barreto Et al., 2005;
equinácea (<i>Equinacea purpurea</i>)	Estimula a resposta imune	ceriodontite	Pannuti et al., 2003; Pistorius et al., 2003;
erva-de-são-jão (<i>Hypericum termum</i>)	Antimicrobiano	candidíase	Fenner et al., 2005;
erva-do-diabo (<i>Plumbago scandens</i>)	Antimicrobiano	candidíase	Paiva et al., 2003;
Eucalipto	Antimicrobiano	ceriodontite	Tarakada et al., 2004;
garcinia (<i>Garcinia manii</i>)	Antimicrobiano	cárie	Addai et al. 2002;
guaco (<i>Mikania laevigata</i>)	Antimicrobiano, Antiinflamatório, Analgésico	cárie	Mourão et al., 1999; Suienaga et al., 2002; Yatsuda et al. 2005;
hamamelis (<i>Hamamelis vrginiana</i> L.)	Antimicrobiano	periodontite	Iauk ,2003;
hortelã-pimenta (<i>Mentha piperita</i>)	Antimicrobiano, Antiinflamatório, Analgésico	gingivite, candidíase	Pannuti et al., 2003; Pistorius et al., 2003; Sartoratto et al., 2004;
lavanda (<i>Lavandula angustiólia</i>)	Antimicrobiano	candidíase	D'Auria et al., 2005;
magnólia (<i>Magnolia officinalies</i>)	Antimicrobiano	cárie e periodontite	Hoo et al. 2001; Huang et al. 2004;
malva (<i>Malva sylvestris</i> L.)	Antimicrobiano, Antiinflamatório	periodontite, gingivite e estomatite	Torres et al., 2000; Buffon et al., 2001;
malvavísco (<i>Althaea officinalis</i>)	Antimicrobiano	periodontite	Iauk ,2003;
mamona (<i>Ricinnus communis</i>)	Antimicrobiano	cárie, periodontite e medicação intracanal	Merkle and Higuchi, 1980; Mordenti et al., 1982; Ferreira 2002;
mandinga (<i>Fagara zanthoxyloides</i>)	Antimicrobiano	periodontite	Sote and Wilson, 1995; Taiwo et al., 1999;
Manga (<i>Mangifera indica</i>)	Antimicrobiano	periodontite	Bairy et al., 2002;
manuka (<i>Leptospermum scoparium</i>)	Antimicrobiano	periodontite	Tarakada et al., 2004;
maracujá (<i>Passiflora incarnata</i>)	Ansiolítico	calmante	Dhawan et al., 2001;
melaleuca (<i>Melaleuca alternifólia</i>)	Antimicrobiano, Antiinflamatório	cárie e gingivite	Grosso et al. 2002; Hammer et al.2003; Takarada et al. 2004; Soukoulis et al. 2004;
melissa (<i>Melissa officinalis</i>)	Ansiolítico	calmante	Kennedy et al., 2004;
mirra (<i>Commiphora myrrha</i>)	Antimicrobiano	gingivite	Pannuti et al., 2003; Pistorius et al., 2003;

Quadro 1. Plantas medicinais com potencial de utilização para a cura de afecções bucais.

Fonte: Castilho et al.⁷ (2007) e Groppo et al.³⁶ (2008).

(continua)

neem (<i>Azadirachta indica</i> A. Juss)	Antimicrobiano	cárie	Butterworth & Morgan 1971; Kou et al. 1990; Shumutterer 1990; Vanka et al., 2001;
nozes (<i>Junglandaceae</i> regia)	Antimicrobiano	cárie	Almas & Al-lafi 1995; Jagtap & Karkera, 2000;
noz-moscada (<i>Myristica fragrans</i> Houtt.)	Antimicrobiano	cárie	Chung et al., 2006;
óleo de eucalipto	Solvente	remoção do cimento endodôntico	Hansen, 1998;
óleo de laranja	Solvente	remoção do cimento endodôntico	Oyama et al., 2002; Martos et al., 2006;
perilla	Antimicrobiano	cárie e periodontite	Yamamoto & Ogawa 2002;
pluméria (<i>Plumeria acuminata</i>)	Antiinflamatório	sinais de inflamação	Gupta et al., 2006;
própolis (<i>Hyptis divaricata</i>)	Antimicrobiano, Antiinflamatório	cárie, periodontite, candidíase, medicação intracanal	Park et al., 1998; Yanagida et al., 2000; Koo et al., 1999 2002; Ota et al., 2001; Gebaraa et al., 2003; Silva et al., Murata, 2004; Hayacibara et al., 2005; Duarte et al., 2006; Bruschi et al., 2006; Oncag et al., 2006;
prunela (<i>Prunela vulgaris</i>)	Antiinflamatório	gengivite	Khalessi et al., 2005
romã (<i>Punicagranatum</i>)	Antimicrobiano, Antiinflamatório	periodontite, candidíase e estomatite	Vasconcelos et al., 2003; Pereira, 2004 e 2006; Sastravaha et al., 2005; Ricci et al., 2006;
saião (<i>Kalanchoe brasiliensis</i>)	Antiinflamatório	sinais de inflamação	Mourão et al., 1999; Koth et al., 2002; Esteves et al., 2005;
sálvia (<i>Salvia officinalis</i> L.)	Antimicrobiano, Antihemorrágico	periodontite, gengivite	Pannuti et al., 2003; Pistorius et al., 2003; Feres et al., 2005;
sanguinária (<i>Sanguinária canadensis</i>)	Antimicrobiano	remineralização, gengivite	Southard et al., 1987; Harper et al., 1990; Tenenbaum et al., 1999; Hong et al., 2005;
soja (<i>Glycine Max</i> L.)	Previne efeitos deletérios da IL-1 β	periodontite	Kut-Lasserre et al., 2001;
tanchagem (<i>Plantago Major</i> L.)	Antimicrobiano	periodontite, estomatite	Buffon et al., 2001; Farias et al., 2002; Bieski, 2005;
toothbrush tree (<i>Streblus asper</i>)	Antimicrobiano	cárie, estomatite	Triratana & Thaweboon 1987; Wongkham et al. 2001; Taweechaisu-papong et al., 2006;
tremoço (<i>Lupinus albus</i>)	Inibe MMPs 1, 2, 3, 7, 9 e 13, TIMPs 1, 2	periodontite	Gaultier et al., 2005;
tribulus (<i>Tribulus terrestris</i> L.)	Antimicrobiano	estomatite	Zhang et al., 2006;
valeriana (<i>Valeriana officinalis</i>)	Ansiolítico	calmante	Riedel et al., 1982; Houghton, 1999; Wheatley, 2005;
vassourão (<i>Vernonia amygdalina</i>)	Antimicrobiano	periodontite	Sote and Wilson, 1995; Taiwo et al., 1999;

Quadro 1. Plantas medicinais com potencial de utilização para a cura de afecções bucais.

Fonte: Castilho et al.⁴ (2007) e Groppo et al.²¹ (2008).

(conclusão)

2.2. MALVA SYLVESTRIS L.

A *Malva sylvestris* L. planta herbácea pertencente à família da Malvaceae Juss (Figura. 1) cresce espontaneamente em quase toda Europa, sua região de origem, além do norte da Ásia, África e região mediterrânea onde é amplamente distribuída. Adapta-se a solos diversificados devido à facilidade de penetração de suas raízes, principalmente em climas temperados. No Brasil é cultivada principalmente na região sul (Lorenzi e Abreu Matos¹⁶ 2008, Alonso³⁸ 1998).

As flores e folhas da *Malva sylvestris* vêm sendo adotadas mundialmente em farmacopéias há anos (Redzic et al.⁶ 2005). Suas propriedades antimicrobianas, antiinflamatórias e cicatrizantes conferidas às flores e folhas desta planta se devem aos principais metabólitos encontrados que são as mucilagens (15% a 20%), antocianinas, flavonóides, taninos, derivados de antraquinonas, pectinas, amido, sacarose, glicosídeos, vitaminas A, B1, B2 e C, substâncias minerais, gorduras, além de ácidos p-cumarínico, clorogênico e cafeico (Billeter et al.⁵ 1990, Alonso³⁸ 1998, Classen e Blaschek³⁹ 1998, Farina et al.⁴⁰ 1995, Cutillo et al.⁴¹ 2006, Conforti et al.⁴² 2008).

Dentre as 49 plantas com potencial antimicrobiano utilizadas no estado do Rio Grande do Sul a *Malva sylvestris* foi citada. Na avaliação microbiológica realizada em difusão em ágar com *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* o extrato metanólico da malva mostrou atividade somente em relação ao *Saccharomyces cerevisiae* cujo halo formado foi entre 8 e 11 mm (Coelho de Souza et al.⁴³ 2004).

Na Turquia, a *Malva sylvestris* L. também foi avaliada entre as 16 plantas utilizadas na medicina tradicional com atividade antimicrobiana do extrato etanólico. As cepas bacterianas selecionadas para o teste foram: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e *Micrococcus luteus*, além das leveduras de *Candida albicans*, *Kluyveromyces fragilis* e *Rhodotorula rubra*. A malva apresentou atividade moderada contra os microrganismos testados quando comparada aos antibióticos padrões. A média do diâmetro do halo de inibição foi de

11 mm e os microrganismos sensíveis foram: *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Mycobacterium smegmatis*, podendo ser empregada para proteção contra algumas bactérias (Dulger e Gonuz⁴⁴ 2004).

Também foi observada a atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas utilizadas como chás na região sudoeste do estado do Paraná. As plantas testadas foram: arruda (*Ruta graveolens*), camomila (*Matricaria chamomilla*), macela (*Achyrocline satureioides*), alcachofra (*Cynara scolymus*), erva-mate (*Llex paraguariensis*), tanchagem (*Plantago major*), malva (*Malva silvestris*), sálvia (*Salvia officinalis*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). Foram preparados extratos aquosos e etanólicos à partir de 10 g de cada planta seca e triturada. A atividade antimicrobiana foi testada através de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*. O extrato aquoso da malva apresentou atividade antioxidante acima de 97% e o extrato etanólico em torno de 85%, porém, em relação à atividade antimicrobiana, o halo de inibição formado (3 mm) estava presente somente ao redor da cepa de *Staphylococcus aureus* (Asolini et al.⁴⁵ 2006).

A capacidade antifúngica da malva foi avaliada em extrato aquoso juntamente com *Anthemis nobilis* L. (camomila), *Cinnamomum verum* J. Presl. (canela), *Lavandula stoechas* L. (lavanda fresca), *Allium sativum* L. (alho) e *Mentha piperita* L. (hortelã-pimenta). Diferentes concentrações destas plantas foram adicionadas ao ágar dextrose de batata (PDA) para analisar o diâmetro das colônias de *Aspergillus candidus*, *Aspergillus Níger*, *Penicillium SP.* e *Fusarium culmorum*. Os extratos mais concentrados de camomila e de malva inibiram totalmente o crescimento dos fungos, sendo que a malva apresentou efetividade superior uma vez que apresentou o mesmo resultado em concentrações inferiores. Os autores concluíram que a *Malva sylvestris* possui excelente atividade antifúngica *in vitro* (Magro et al.⁴⁶ 2006).

A atividade bacteriostática das antocianinas presentes na *Malva sylvestris* foi testada observando-se a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger* em meio de cultura sólido e líquido. As concentrações de antocianinas empregadas foram: 10, 20 e 30 g.L⁻¹, sendo o halo de inibição de 6, 13,5 e 16 mm respectivamente em meio sólido. A inibição ocorreu

somente para crescimento de *Staphylococcus aureus* em ambos os meios de cultura, demonstrando ainda um padrão de inibição dependente da concentração de antocianina, confirmando sua capacidade bacteriostática (Cheng e Wang⁴⁷ 2006).

A atividade antiinflamatória local da *Malva sylvestris* foi testada pela necessidade de estudos pré-clínicos e clínicos. Foi induzido edema de pata em ratos com aplicação de carragenina a 1% e posterior aplicação do veículo hidrossolúvel do creme, indometacina a 2% e creme de malva a 2%, 5% e 20% entre a 1ª e 4ª hora. Houve redução significativa do edema na 3ª h com a utilização do creme de malva a 5% sendo este efeito superior a indometacina 2%. Não houve redução significativa pela aplicação de cremes de malva a 10 e 20%. Este estudo comprovou a eficácia do uso tópico da malva em relação à atividade antiinflamatória em ratos (Chiclana et al.⁴⁸ 2009).

Um estudo comparativo sobre o potencial nutricional e farmacológico das folhas, flores frutos imaturos e caule florescido a *Malva sylvestris* confirmou seu potencial como planta medicinal. De todos os componentes da planta, as folhas possuem o melhor potencial terapêutico devido à propriedade antioxidante incluindo a redução de radicais. Isto ocorre pela abundância de flavonóides, além de fenóis, carotenóides, tocoferóis, ácido linoléico e minerais. As flores são ricas em ácido ascórbico, carboidrato e principalmente açúcares como frutose e glucose. As frutas possuem menor potencial nutraceutical devido à baixa concentração das substâncias acima citadas. Baseado na composição, este estudo demonstra a capacidade antimicrobiana e antiinflamatória da planta (Barros et al.⁴⁹ 2010).

Foi comparada a eficácia do extrato da *Malva sylvestris*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* com digluconato de clorexidina a 20% sobre o cultivo de bactérias coletadas do biofilme dental de 37 amostras. Os resultados mostraram que os extratos tiveram inibição total e parcial em torno de 60% comparado a 100% de inibição pela clorexidina. As bactérias que cresceram no interior do halo eram transitórias, não sendo, portanto, significativas para o desenvolvimento de lesões cáries e de doenças periodontais. Os autores concluíram que as plantas testadas demonstram potencial antimicrobiano, porém, mais estudos devem ser conduzidos para confirmar estes resultados (Buffon et al.⁵⁰ 2001).

Um estudo *in vitro* foi conduzido para analisar a ação antioxidante da *Malva sylvestris* através do nível de absorbância de DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) e de NBT (Nitroblue Tetrazolium) após a decocção das folhas e

flores. Posteriormente 80 animais divididos em 4 grupos receberam tratamento durante 15, 30, 60 e 90 dias demonstrando que a preparação com esta planta possui excelente atividade antioxidante, novamente devido à elevada quantidade de flavonóides em suas folhas, o que propicia seu potencial antiinflamatório (Marouane et al.⁵¹ 2011).



Figura 1. Folhas da *Malva sylvestris* L.



Figura 2. Flores da *Malva sylvestris* L.

Devido à rica composição em flavonóides e taninos a *Malva sylvestris* L. pode ser indicada para o tratamento de afecções bucais como abscesso dento-alveolar, gengivite, lesões mucosas, aftas (Gasparetto et al.⁴ 2012, Guarrera⁵² 2005) além de já estar registrada na ANVISA como fitoterápico, classificada como demulcente de uso oral, indicado para o tratamento de inflamações orofaríngeas (Carvalho et al.¹⁷ 2008).

2.3. LESÕES: MUCOSA BUCAL

Há diversas formas de provocar alterações na mucosa bucal, incluindo agressão física direta como cortes, queimaduras, ulcerações decorrentes de radiação, irritação química ou a própria colonização por microrganismos, além de exodontias e cirurgias de implantes e mucogengivais (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008).

Dependendo da extensão linear e da profundidade a resolução das feridas em mucosas bucais poderá ocorrer por primeira intenção (cirurgias periodontais a retalho e colocação de implantes) ou por segunda intenção como ocorre após exodontias (Peterson⁵⁴ 2005, Nemcovsky et al.⁵⁵ 2000)

O reparo por segunda intenção ocorre em casos em que a lesão possui maior extensão epitelial em largura e profundidade, sem que seja possível a coaptação de suas bordas, podendo até mesmo ocorrer a exposição da tábua óssea. Consequentemente há necessidade de neoformação tecidual extensa. Um exemplo típico deste tipo de reparo são as cirurgias de enxerto gengival livre, retalho pediculado e gengivectomia (Nemcovsky et al.⁵⁵ 2000, Farnoush⁵⁶ 1978, Del Pizzo et al.⁵⁷ 2002). Neste caso, o intervalo de tempo necessário para que o fechamento da ferida ocorra é praticamente o dobro, podendo cada uma das fases serem alteradas prejudicando a sua conclusão (Del Pizzo et al.⁵⁷ 2002, Guo e DiPietro⁵⁸ 2010).

Dentre os fatores que alteram o reparo tecidual, além dos aspectos sistêmicos como diabetes, obesidade e uso crônico de alguns medicamentos, a contaminação bacteriana e a alteração da fase inflamatória por trauma mecânico ou químico são consideradas os responsáveis por este processo (Guo e DiPietro⁵⁸ 2010)

Neste caso, a indicação do uso tópico como medicamento fitoterápico na fase pós-operatória, pode contribuir de forma significativa para reduzir a formação de biofilme dental favorecendo ou acelerando a neoformação tecidual (Kozlovsky et al.⁵⁹ 2007, Hammad et al.⁶⁰ 2011).

2.4. TECIDO MUCOSO PALATINO

A cavidade bucal apresenta discretas diferenças em relação ao epitélio formado (Tabela 2).

O palato representa anatomicamente o assoalho da cavidade nasal e o teto da cavidade bucal. É recoberto por epitélio escamoso estratificado que pode se apresentar ortoqueratinizado ou paraqueratinizado. Além do epitélio bucal os tecidos que recobrem o palato são a lâmina própria (camada de tecido conjuntivo) cujas papilas interdigitam-se entre as cristas epiteliais formando uma junção separada pela lâmina basal que aparece como uma monocamada sem estruturas (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Cornelissen et al.⁶¹ 1999).

A mucosa é aderida ao tecido ósseo palatino através do mucoperiósteo, que é formado por uma camada frouxa de gordura ou de tecido conjuntivo glandular, contendo nervos e vasos sanguíneos principais que gera

Região	Epitélio	Lâmina própria	Submucosa
Mucosa de revestimento			
Mucosa labial e bucal	Espesso, não-queratinizado	Papilas de TC arredondadas e irregulares, algumas fibras elásticas, vascularização extensa	Presente, com TA e GSMe com forte inserção nos músculos
Mucosa alveolar	Delgado, não-queratinizado	Papilas de TC algumas vezes ausentes, muitas fibras elásticas vascularização extensa	Presente, com GSMe e muitas fibras elásticas; inserção frouxa em músculo ou osso
Assoalho da cavidade oral e face inferior da língua	Extremamente delgado, não-queratinizado	Suprimento vascular extenso	Presente. Assoalho: adiposa e associada às GSuM e SuL; Frouxamente inserida em osso /ou músculo. Inferior da língua: delgada e firmemente inserida em músculo
Palato mole	Delgado Não-queratinizado	Espessa com numerosas papilas de TC e camada elástica distinta	Extremamente delgada com TA e GSMe; inserção firme em músculos adjacentes
Mucosa mastigatória			
Gengiva inserida	Espesso Principalmente paraqueratinizado, ortoqueratinizado em algumas partes	Elevada, papilas de TC estreitas, vascularização extensa atuando como mucoperiósteo	Ausente
Palato duro	Espesso ortoqueratinizado	Parte medial: pregas palatinas transversas e rafe atuando como mucoperiósteo	Presente somente nas porções laterais. A parte anterior apresenta TA e a posterior GSMe. Ausente na parte medial, nas pregas palatinas transversas e na rafe
Mucosa especializada			
Superfície dorsal da língua	Espesso Epitélio queratinizado e não-queratinizado, com 3 tipos de papilas linguais e algumas com botões gustativos	Papilas longas, GSMe na porção posterior; rica em inervação principalmente próximo aos botões gustativos; plexo papilar na camada papilar, grandes vasos	Não há camada distinta; a mucosa está aderida ao TC que cerca a musculatura da língua

Quadro 2. Diferenças regionais da mucosa bucal.

Fonte: Nanci e Ten Cate⁵⁰ (2008).

Nota: TC - tecido conjuntivo, TA - tecido adiposo, GSMe – glândulas salivares menores, GSuM – Glândulas Submandibulares, GSuL- Glândula sublingual.

uma inserção firme e inelástica. Diferentemente da pele, a mucosa palatina possui coloração rósea em condições de homeostasia, a superfície é úmida e não apresenta anexos (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999).

A integridade estrutural do epitélio bucal é mantida por um processo de renovação celular contínua. Nas três primeiras camadas do epitélio (camada basal) ocorre a multiplicação celular por mitose através de células progenitoras que são os queratinócitos. À medida que ocorre a renovação celular estas células migram para a superfície, passando por um processo de diferenciação e maturação (camada espinhosa, granulosa e queratinizada) com o objetivo de substituir as células descamadas. A maturação do tecido mucoso palatino representa a orto ou paraqueratinização (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008).

O tempo de renovação epitelial do palato duro é um dos mais baixos dentre os tecidos epiteliais bucais, ocorrendo em 24 dias. Isto ocorre devido à diferença de padrão de maturação ou queratinização. A mucosa bucal não-queratinizada renova-se 1,5 vezes mais rapidamente que a gengiva inserida queratinizada. Porém, há fatores que podem interferir na capacidade de renovação celular como o estresse mecânico e a inflamação. A presença de infiltrado inflamatório leve favorece a mitose, por outro lado, quadro de inflamação intensa reduz esta capacidade. Além disso, algumas citocinas são capazes de influenciar este processo de renovação, como o fator de crescimento epidérmico, fator de crescimento queratinócito, fator de crescimento transformador α e β e interleucina-1 (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁴ 1997).

2.5. PROCESSO DE REPARO DA LESÃO

Após o estabelecimento da lesão e formação de coágulo, três eventos celulares e diversos bioquímicos ocorrerão em função do tempo, independentemente do tecido epitelial lesionado. Estas fases denominadas inflamação, proliferação e maturação, ocorrem sequencialmente. Este é um sistema complexo que envolve processos biológicos e imunológicos, em que uma falha ou o prolongamento de uma destas fases poderá retardar ou não permitir a total reepitelização da lesão (Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Martin⁶⁶ 1997, Singer e Clark⁶⁷ 1999, Broughton et al.⁶⁸ 2006).

2.5.1 Hemostasia

Poucos minutos após o rompimento dos vasos sanguíneos ocorre o extravasamento de plaquetas sobre o tecido colágeno subendotelial, havendo a ativação da cascata de coagulação. Este contato entre o colágeno e as plaquetas, além da presença de trombina e fibronectina promove a liberação de citocinas e de fatores de crescimento como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), fator ativador de plaquetas (PAF), fibronectina e serotonina. Esta rede de fibrina formada no local da lesão favorece a invasão de células inflamatórias e a deficiência em sua formação pode causar retardo de resolução, adesão secundária de células e redução de quimiotaxia. Além de proteger o tecido exposto, o coágulo forma uma barreira hemostática que une as margens da lesão (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

2.5.2 Inflamação

Os eventos que ocorrem neste momento são típicos de um quadro inflamatório agudo. Com o aumento da permeabilidade vascular, ocorre a migração das células inflamatórias para o local da lesão, além da liberação de citocinas e fatores de crescimento e ativação de células. Dentre estas células estão neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

As primeiras células a migrarem para o local da lesão são os polimorfonucleares, na qual a principal célula é o neutrófilo. Sua migração se deve à liberação de prostaglandinas pelo aumento da permeabilidade vascular e pelo gradiente de concentração de fator quimiotático, como fatores complemento, interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), TGF- β , fator de plaqueta 4 (PF4) e produtos bacterianos. A selectina, receptor endotelial, auxilia na adesão do neutrófilo ao epitélio (marginação) e a integrina, presente em sua superfície facilita a ligação à matriz extracelular. Esta migração leucocitária por diapedese ocorre desde as primeiras horas após a lesão e alcança a concentração máxima em aproximadamente 24 horas, tendo o neutrófilo curta duração de vida. O papel dos

neutrófilos nesta fase será reduzir a invasão bacteriana e restos celulares através de enzimas proteolíticas (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

Após 24 h, as próximas células a chegarem ao local da lesão são os monócitos predominantemente que se diferenciam em macrófagos, permanecendo durante cinco dias aproximadamente. Sua função será mediar a angiogênese, a diferenciação de fibroblastos, a síntese de óxido nítrico e a estimulação de queratinócitos. Esta colonização depende de fatores quimiotáticos liberados por plaquetas no coágulo de fibrina, queratinócitos nas margens da lesão, fibroblastos e leucócitos além de receptores celulares, resultando em uma resposta humoral e celular e na fagocitose do tecido lesionado e de corpos estranhos (Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006)

Os fatores de crescimento liberados como PDGF, TGF- β , PAF, interleucina-1, quimiocinas e citocinas são essenciais para a fase de reparação, devido à suas funções de recrutar e diferenciar células. Os macrófagos também expressam citocinas responsáveis pela quimiotaxia de linfócitos. O linfócito é o subtipo de leucócito mais presente na lesão nesta fase. O TGF- β estimula a síntese de proteínas da matriz extracelular e a proliferação de fibroblastos e que acelera o fechamento da lesão produzindo tecido reparador (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

A ativação de mastócitos regula a velocidade de reparação de lesões cutâneas, por influenciar a formação de vasos sanguíneos e a quimiotaxia de neutrófilos, que na fase inicial são essenciais para perpetuar a reepitelização visto que determinam a liberação de mediadores químicos (Weller et al.⁷⁰ 2006),.

Os mastócitos normalmente localizados próximo à vasos sanguíneos, liberam mediadores pró-inflamatórios, que além da inflamação promovem alterações vasculares, mitose e diferenciação celular durante a fases de resolução de lesões mucosas (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Weller et al.⁷⁰ 2006, Artuc et al.⁷¹ 1999)

Durante a fase de hemostasia, os mastócitos secretam fatores quimiotáticos como fator de necrose tumoral, histamina, serotonina, proteases, leucotrienos e interleucinas que contribuem para a formação do coágulo, quimiotaxia adicional de leucócitos, neste caso, principalmente neutrófilos e monócitos. Nesta mesma fase outras substâncias são sintetizadas e liberadas pelos mastócitos como

a calecraína, fibrinopeptídios a partir do fibrinogênio e produtos da degradação de fibrina que regulam a expressão de moléculas de adesão (Li et al.⁶³ 2007, Weller et al.⁷⁰ 2006, Noli e Miolo⁷² 2001, Zeinoun et al.⁷³ 2009).

Com a liberação destes mediadores químicos, há indução do processo de reepitelização devido à estimulação de fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos na fase proliferativa, que são células essenciais para o restabelecimento de lesão em virtude das estruturas que irão formar em substituição ao tecido mucoso removido. A heparina, um dos mediadores produzidos pelos mastócitos, participam da diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos promovendo a contração de lesão (Weller et al.⁷⁰ 2006, Zeinoun et al.⁷³ 2009, Maurer et al.⁷⁴ 1997).

Diversas células inflamatórias, incluindo linfócitos T e macrófagos expressam a osteopontina, outra citocina importante acumulada em tecidos calcificados também conhecida como ativação precoce 1 de linfócitos T. A osteopontina está associada à ativação de macrófagos por atuarem como opsoninas que auxiliam os macrófagos a englobarem materiais, inclusive bactérias. Desta forma ocorre a elevação dos níveis de citocinas, que mantêm o processo de reparo tecidual pela continuidade da migração e diferenciação celular (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Witte e Barbul⁶⁵ 1997)

2.5.3 Reparação

A reparação do tecido lesionado e o processo inflamatório são reações inversamente proporcionais, pois à medida que reduz a fase inflamatória aguda, inicia a regeneração tecidual no epitélio e posteriormente no tecido conjuntivo.

Após 24 h as células epiteliais perdem contato uma com as outras nas margens da lesão e com o tecido conjuntivo subjacente, evidenciando-se como um aumento do espaço intercelular.

Entre 24 e 48 h após a lesão inicia-se o processo de mitose na camada basal do epitélio, promovendo uma migração destas células em sentido lateral em direção às margens da lesão sob o coágulo. Este movimento sobre o tecido conjuntivo é facilitado pela deposição de constituintes da lâmina basal pelas células epiteliais, o que favorece a formação do citoesqueleto. Após a migração

celular ocorre a adesão destas células além da redistribuição dos receptores de integrinas na membrana e interação com a laminina-5 que dão origem aos hemidesmossomas (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997).

Ao mesmo tempo as células suprabasais estão deslizando sobre as células basais e o processo de migração lateral continua até o momento em que ocorre o contato entre as margens epiteliais. A partir do contato margem a margem a divisão celular ocorrerá com o objetivo de estratificar a camada e posteriormente diferenciar as células até que haja a normalização da arquitetura do tecido epitelial (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Witte e Barbul⁶⁵ 1997).

O tecido conjuntivo, logo após a lesão, será formado por fibrina, tecido necrótico e infiltrado inflamatório celular agudo. Durante 24 h ocorrerá a proliferação de fibroblastos oriundos da divisão da própria população de fibroblastos íntegros da periferia da lesão e de células mesenquimais indiferenciadas através da sinalização de PDGF e EGF derivados de plaquetas e macrófagos. As células resultantes destas duas fontes irão sintetizar nova matriz composta por colágeno tipo III, glicosaminoglicanos, proteoglicanos e fibronectina, formando o tecido de granulação para promover a neoformação tecidual (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

O início da angiogênese se dá pela expressão sinérgica de fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos e TGF- β , TNF- α e também pela presença de moléculas da matriz extracelular como a fibronectina, laminina e o colágeno que são fontes de fatores de crescimento responsáveis pela estimulação de migração celular. Células endoteliais iniciam a fase de proliferação além da formação de capilares que se formam a partir de vasos preexistentes nas margens da lesão que irão fornecer nutrientes, oxigênio e secretar substâncias bioativas como células endoteliais além de permitir a migração de células inflamatórias para o local (White et al.(Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

Após três dias, a lâmina própria será predominantemente celular, formada por células inflamatórias, capilares em desenvolvimento e grande quantidade de fibroblastos depositados entre fibrinas remanescentes e novas fibras colágenas. A maturação ocorrerá pelo aumento da secreção de colágeno entre o 5º e o 30º dia após a agressão, sendo em média 80% colágeno do tipo I e 20%

colágeno do tipo III. Este aumento é proporcional à força de tensão exercida sobre o tecido, porém, podem ser necessários 150 dias para atingir a recuperação total de um tecido. Em média são necessários 20 dias para que a quantidade de células e fibras seja semelhante a de um tecido normal (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

2.5.4 Persistência da resposta inflamatória

Casos em que o processo inflamatório se estende por um período de tempo maior retardam a resolução de lesão. A causa é o desequilíbrio entre a atividade proteolítica e a destruição tecidual no local a ser reparado. A presença de neutrófilos e macrófagos produz grande quantidade de proteinases, inclusive metaloproteinases da matriz (MMP). Queratinócitos e fibroblastos presentes no tecido estimulam esta mesma produção e os componentes bacterianos aliados ao tecido em processo de degradação perpetuam o retardo da reparo por estimular a manutenção de um fluxo contínuo de células inflamatórias para o local lesionado (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006).

2.5.5 Contração da ferida e formação de cicatriz

Somente dois aspectos diferem em relação ao reparo de lesões da pele e do tecido mucoso bucal: a velocidade de fechamento da lesão e a contração do tecido de cicatrização. Na cavidade bucal, a velocidade de reparo é maior e a contração do tecido será discreta, porque a quantidade de fibroblastos em lesões mucosas bucais é menor comparado à quantidade destas células presentes na pele. (Clark⁷⁵ 1996, Szpadarska et al.⁷⁶ 2003, Van Beurden et al.⁷⁷ 2005).

Porém, apesar de mínima, inevitavelmente ocorrerá a contração da ferida que ocorre em virtude do retardo da resposta inflamatória. Ao controlar a infecção, a resolução da atividade inflamatória favorece a rápida restauração da integridade da ferida, que é a sua função, porém, o resultado é um tecido com menor qualidade em fibras colágenas comparado ao tecido íntegro, deixando uma cicatriz (Van Beurden et al.⁷⁷ 2005, Funato et al.⁷⁸ 1999).

As células responsáveis por esta contração da ferida são os miofibroblastos ou fibroblastos contráteis estimulados pelo TGF- β 1 e PDGF, presentes na lesão do 4º ao 22º dia. Estas células possuem fibras de actina e miosina o que lhes atribui capacidade contrátil por apresentar junções entre si e com as fibrilas do tecido conjuntivo. Ao se contraírem são capazes de aproximar as margens da ferida, reduzindo a superfície da área e facilitando a cicatrização. O colágeno depositado por estas células pode levar à rigidez e perda de mobilidade da área, prejudicando a função. Porém, na cavidade bucal o tecido cicatricial formado é remodelado, podendo a maioria das cirurgias bucais serem realizadas sem a preocupação de perda de função do tecido (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006, Broughton et al.⁶⁹ 2006, Cornelissen et al.⁷⁹ 2000).

3. PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

Avaliar em modelo animal a capacidade de modulação de reparo do agente fitoterápico (*Malva sylvestris* L.) em lesão de mucosa palatina confeccionada cirurgicamente em ratos.

Objetivos Específicos

- Analisar o padrão macroscópico de reparo da ferida entre os grupos experimentais em função do tempo;
- Quantificar a influência da *Malva sylvestris* L. nas alterações histológicas e no reparo de lesão da mucosa palatina em ratos Wistar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi fornecido por Quimer Ervas e Especiarias (São Paulo, Brasil). A *Malva sylvestris* L. estabilizada e rasurada foi mantida em sua embalagem original, sempre fechada e em local seco, arejado, longe do calor e da umidade com o objetivo de preservar as suas características físico-químicas e microbiológicas. De acordo com o certificado do fornecedor a planta foi colhida no sul do Brasil em janeiro de 2008 e possuía validade de dois anos e as partes utilizadas foram as folhas e o caule.

4.2. EXTRATO BRUTO HIDROALCÓOLICO DA *Malva sylvestris* L.

Após a cominuição e trituração da planta estabilizada e rasurada, foi obtido o pó moderadamente grosso (Farmacopéia Brasileira⁸⁰ 2000).

Para corrigir a concentração do líquido extrator utilizado na etapa de maceração dinâmica (World health organization⁸¹ 1998) foi determinado o teor de umidade do material pulverizado e tamisado através do ensaio gravimétrico de perda por dessecação. Para isso, foram pesadas 4 g das partículas em triplicata. Posteriormente, as placas de Petri com as partículas foram mantidas em estufa a 105 °C durante três dias ou até que a massa atingisse estabilidade. Após esta etapa o material foi transferido para o dessecador contendo sílica gel para a redução da temperatura sendo posteriormente pesado novamente. A umidade média foi de 9,08% sendo este valor obtido através da diferença existente entre o peso inicial (massa total úmida) e o peso final (massa total seca).

O próximo passo foi a adição de 50 g de droga vegetal em 220 mL de etanol a 72 °GL e submissão desta à maceração dinâmica em mesa agitadora orbital MA140/CF (Marconi®, Piracicaba, Brasil) durante sete dias em temperatura ambiente. Ao material sólido resultante após passagem por peneira doméstica foi acrescentado 250 mL de etanol a 72°GL, sendo posteriormente duplamente filtrado em funil de vidro com papel filtro qualitativo (80 g m⁻² com porosidade de 3 µm).

Para elevar 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 em 58 rpm, sendo finalmente congelado a -80 °C.

Com o objetivo de preservar as substâncias ativas da malva, o extrato foi liofilizado (Liofilizador L20, LIOTOP®, São Carlos, Brasil). Após esta etapa o extrato foi armazenado em freezer a -40°C.

4.3. DESENVOLVIMENTO DA FORMA FARMACÊUTICA

Ao extrato bruto hidroalcoólico (EBHC) da *Malva sylvestris* L. foi acrescentado o veículo adesivo orabase (Gelatina, pectina e carboximetilcelulose em base de óleo mineral polietileno, em partes iguais) para formar a concentração de 20% de EBHC de *Malva sylvestris* L. em orabase. Esta manipulação foi realizada previamente ao momento da aplicação tópica.

O digluconato de clorexidina foi manipulado em gel aquoso de polímero não-iônico de hidroxietilcelulose (Natrosol® - PharmaSpecial®, São Paulo, Brasil) a 2% (m/m), utilizando a técnica geral de incorporação de ativos em bases galênicas (Ferreira⁸² 2002), conforme as formulações preconizadas na literatura (Appel e Réus⁸³ 2003). Os princípios ativos foram misturados com o auxílio do gral e do pistilo de porcelana e pré-dissolvidos em água destilada. Gradativamente, foi acrescentado o gel base de natrosol (Hidroxietilcelulose – HEC). Cada formulação foi acondicionada em potes de polietileno de alta densidade e rotulada. De acordo com (Ferreira⁸⁴ 2001), foi estabelecido o prazo de validade de 3 meses para cada uma das formulações.

Para cada substância química foi feita a pesagem com exatidão, em função da concentração e todas as substâncias foram armazenadas em refrigerador à -20 °C após a manipulação.

Essa fase de obtenção das formas farmacêuticas assim como do extrato bruto hidroalcoólico da *Malva sylvestris* foi desenvolvida no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UEPG, utilizando técnicas de desinfecção e anti-sepsia preconizadas à manipulação farmacêutica (Pelczar et al.⁸⁵ 1996, Thompson e Davidow⁸⁶ 2004, BRASIL et al.⁸⁷) por equipe treinada para este fim e com acompanhamento de profissional especializado.

4.4. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados 136 ratos (*Rattus Norvergicus albinus Wistar*) com 60 dias de idade, pesando em média 270-300 g, divididos em 5 grupos (Tabela 1). Os animais receberam ração balanceada e água *ad libitum*, sendo mantidos durante todo o período experimental em sala com temperatura ambiente (21 ± 3 °C) sob ciclo de iluminação natural de 12/12 horas e 4 animais por gaiola e foram pesados no início e antes do sacrifício.

A manipulação dos animais seguiu as recomendações da SBCAL-COBEA (Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório⁸⁸ 2011).

Tabela 01- Divisão dos animais em 4 grupos experimentais.

Grupos	Tratamento	Períodos Experimentais (Dias)					Total
		0	3	7	15	21	
G0	Lesão inicial	8	---	---	---	---	8
G1	Sem tratamento (controle)	---	8	8	8	8	32
G2	Orabase	---	8	8	8	8	32
G3	Clorexidina a 2%	---	8	8	8	8	32
G4	Malva 20%	---	8	8	8	8	32
Total		8	32	32	32	32	136

Fonte: O autor.

O G0 (lesão inicial) representa os animais que foram sacrificados logo após a confecção da lesão (n=8), o G1 (n=32) caracteriza o grupo cuja lesão palatina foi confeccionada com o bisturi circular, porém, os animais não receberam qualquer tipo de tratamento (controle). Os demais grupos (G2, G3 e G4) receberam tratamento com Orabase (veículo utilizado no preparo da malva a 20%), Clorexidina 2% em gel natrosol (hidroxietilcelulose) e Malva 20% respectivamente de acordo com os períodos experimentais.

O procedimento para anestesia intraperitoneal foi realizado utilizando uma associação de quetamina (100 mg/mL) e relaxante muscular xilasina (100 mg/mL), diluindo-se 3,75 mL da solução de quetamina com 0,5 mL de xilasina em 5,75 mL de água destilada, sendo administrados 0,2 mL/100g (Mezadri et al.⁸⁹ 2004).

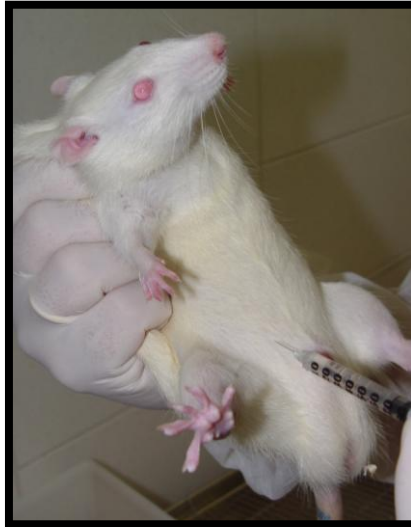


Figura 03. Aplicação anestésica intraperitoneal.



Figura 04. Posicionamento do animal na mesa cirúrgica após a anestesia.

Para a confecção da lesão na mucosa palatina foi utilizado um bisturi circular (Silverline Leather Punch, Reino Unido) com extremidade ativa de 4 mm de diâmetro produzindo assim uma ferida circular. A lesão foi realizada sempre atrás da segunda ruga palatina, posicionada entre os primeiros molares superiores. Após a incisão a mucosa palatina foi removida com um descolador de periósteo modelo Freer CG (Golgran, linha Millennium, Brasil), deixando exposto o tecido ósseo.

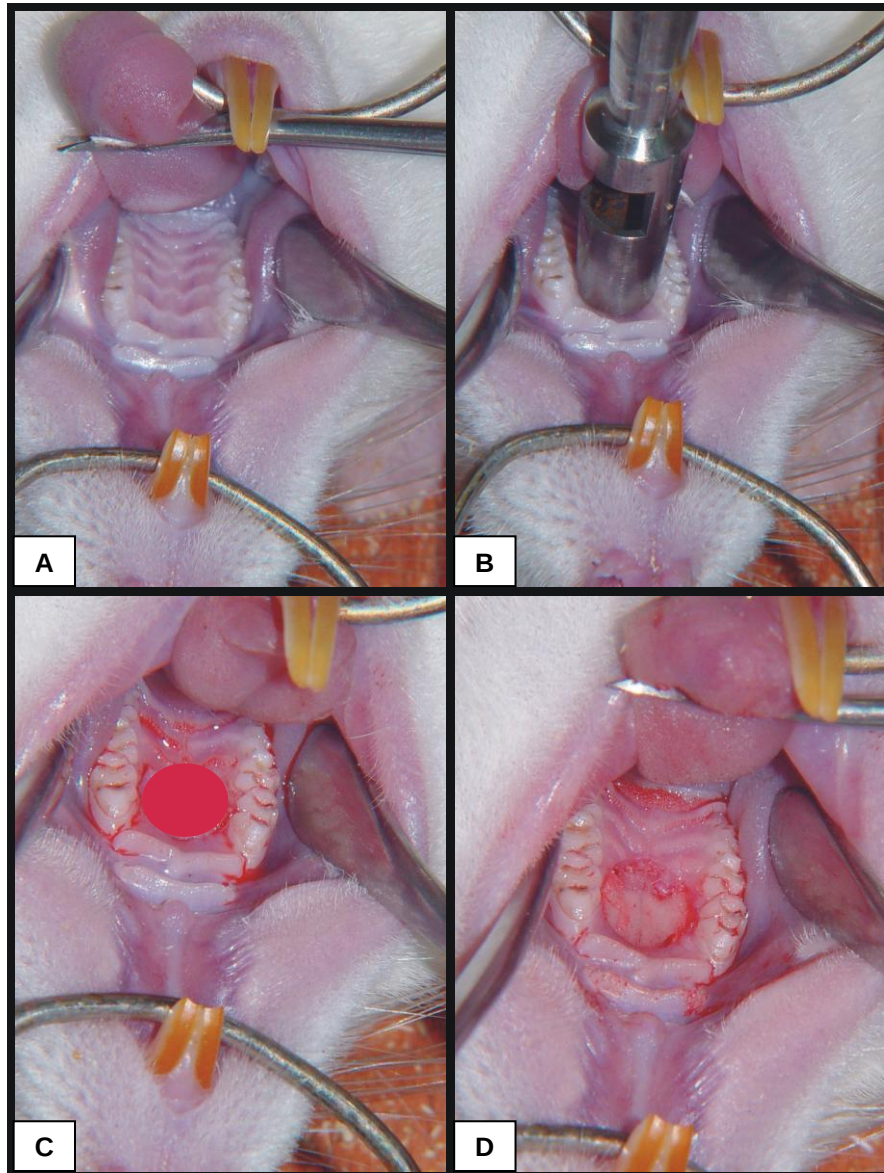


Figura 05. Palato íntegro (A); Confeção da lesão posteriormente à 2ª ruga palatina com “punch” de 4 mm (B); Delimitação da ferida pelo bisturi circular; remoção da mucosa palatina expondo o tecido ósseo (D).

Vinte e quatro horas após a confecção da lesão palatina, os animais foram imobilizados sem serem anestesiados, e em seguida, aplicado topicamente 25 mg das substância com o auxílio de uma espátula de plástico identificada pelo nome da substância 25 mg, duas vezes ao dia, totalizando 50mg ao dia, sendo: Grupo 1- Sem tratamento (controle); Grupo 2- Veículo orabase; Grupo 3- Clorexidina 2% e Grupo 4- Malva 20% em orabase. Após a aplicação, as substâncias recobriam toda a ferida palatina (Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Kahnberg e Thilander⁹⁰ 1982, Seymour et al.⁹¹ 1983). Para padronizar a quantia exata de 25 mg, foi adaptado em uma espátula de madeira um recipiente cujo interior quando totalmente preenchido atingia o peso de 25 mg para cada uma das substâncias (Figura 06). Este peso de

25 mg para cada uma das substâncias foi verificado em balança analítica de precisão (Shimadzu AY220, Japão). Após a aplicação, as substâncias recobriam toda a ferida palatina (Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Kahnberg e Thilander⁹⁰ 1982, Seymour et al.⁹¹ 1983).

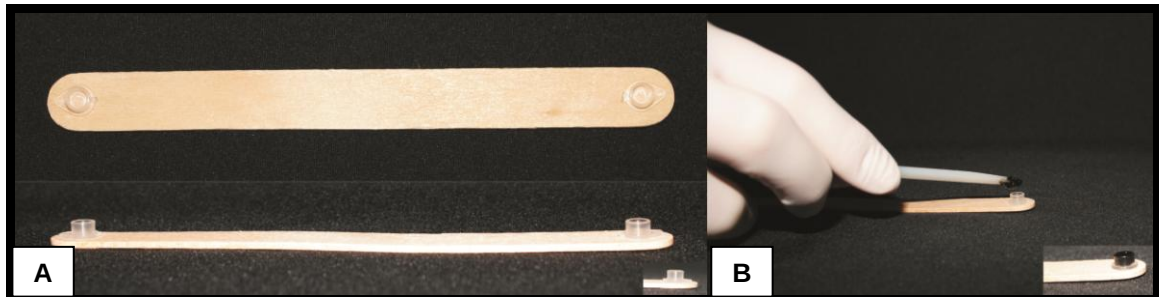


Figura 6. Espátula de madeira adaptado para a padronização de 25mg de cada uma das substâncias (A); Aplicação da substância no dispositivo com o auxílio da espátula de plástico (B).

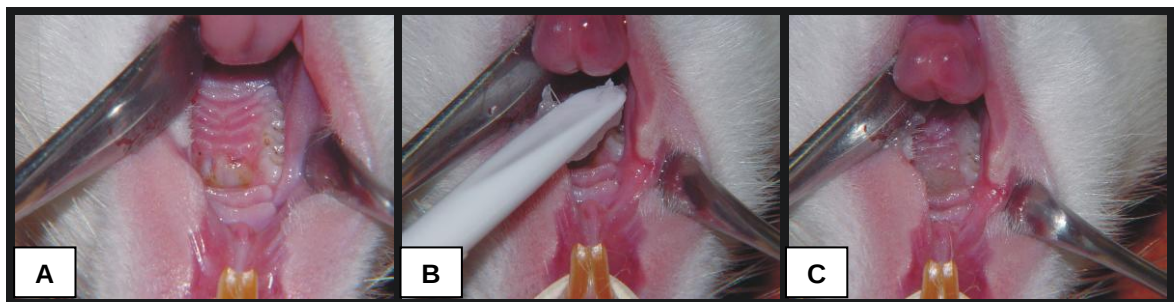


Figura 7. Visualização da lesão (A); Aplicação da Orabase (B); Substância sobre a lesão (C).

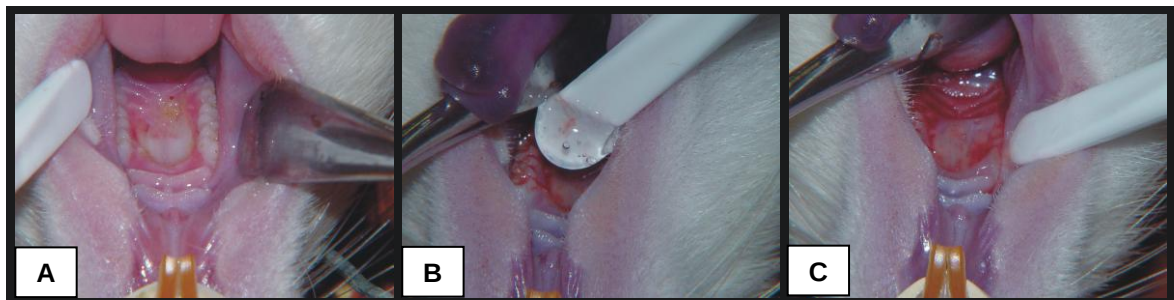


Figura 8. Visualização de lesão (A); Aplicação da Clorexidina 2% (B); Substância sobre a lesão (C).



Figura 09. Visualização de lesão (A); Aplicação da Malva 20% (B); Substância sobre a lesão (C).

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia prévia (de acordo com o protocolo SBCAL-COBEA), nos períodos de 0, 3, 7, 15 e 21 dias (Witte e Barbul⁶⁵ 1997).

4.5. ANÁLISE MACROSCÓPICA

Para mensuração o padrão de reparo da mucosa palatina foram obtidas fotos digitais (Sony Cybershot DSC 707[®], Sony Brasil Ltda, São Paulo, SP, Brazil) padronizadas em relação à abertura, intensidade do “flash” e tempo de exposição e distância focal da região palatina com uma sonda milimetrada (UNC 15 mm periodontal probe, Hu-Friedy do Brasil, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) sobreposta à face oclusal dos molares (padrão de referência). A medida da área em milímetros quadrados da lesão foi realizada com o auxílio do programa de análise Image Pro Plus 4.5[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

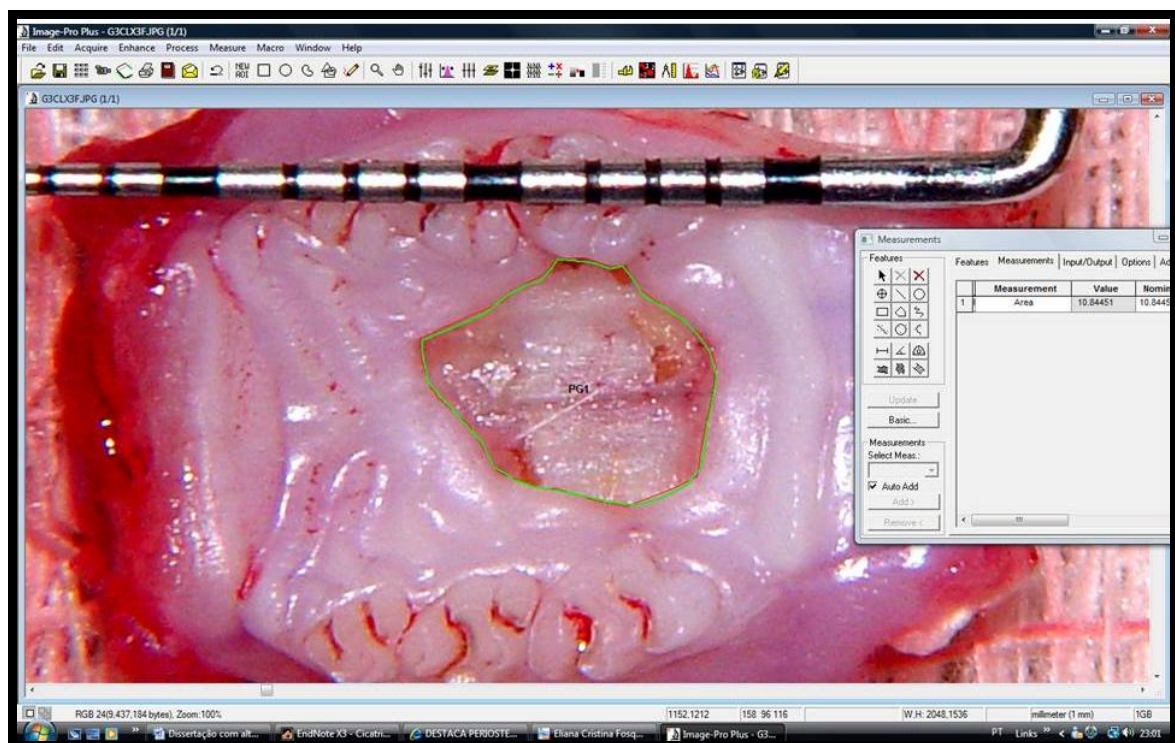


Figura10. Mensuração da área da lesão através do software Image Pro Plus 4.5[®].

4.6. ANÁLISE HISTOMÉTRICA

Oito maxilas de cada grupo dos diferentes tempos contendo a ferida palatina foram removidas, dissecadas e seccionadas em seu eixo sagital, tendo como referência o centro da área da lesão. As peças foram fixadas em formol tamponado a 4% durante 48 horas e descalcificadas em solução de EDTA a 5%, trocando-se a solução a cada 48 horas durante 40 dias. Após lavagem durante 24 horas em água corrente, as peças passaram por processo de desidratação (escala gradual de álcool em diferentes concentrações), foram diafanizadas (xilol) e incluídas em blocos de parafina, sendo então, obtidos cortes seriados de 6 μ m de espessura que foram corados com Hematoxilina-Eosina (Wagener et al.⁹² 2003). As lâminas foram fotografadas em microscópio de luz com câmera digital acoplada (Olympus BX41, DP-72, Japan) em aumento de 40x e mensurada a porcentagem de reparo em cada um dos períodos avaliados. Esta porcentagem foi obtida pela mensuração da distância inter-palatina, tendo como referência o início do epitélio juncional dos molares direito e esquerdo e por uma segunda mensuração realizada entre as margens do epitélio. As medidas foram realizadas através do programa para a análise digital Image Pro Plus 4.5[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

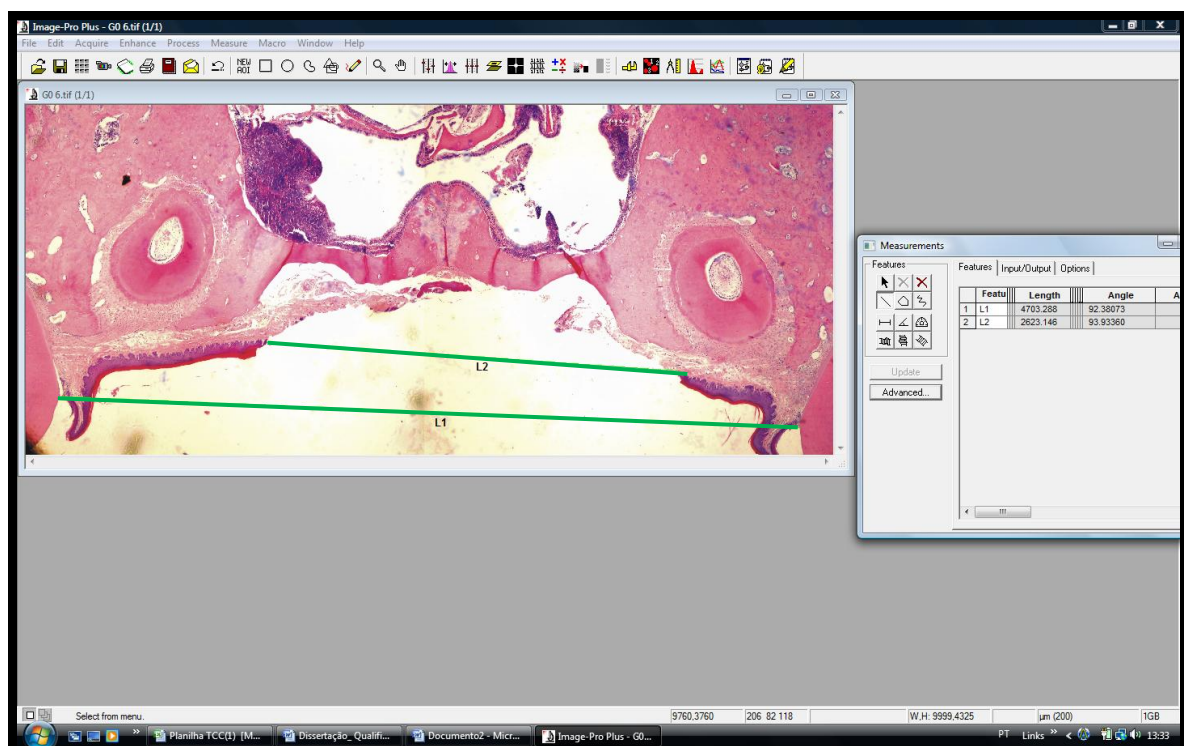


Figura 11. Mensuração da distância histológica entre as margens epiteliais através do software Image Pro Plus 4.5[®].

Em ambas as análises as medidas foram realizadas por um único examinador cego, treinado e calibrado e em triplicata sendo utilizada a média aritmética para a análise estatística dos dados obtidos.

4.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

As imagens foram avaliadas em microscópio de luz com câmera digital acoplada (Olympus BX41, DP-72, Japan) utilizando os aumentos de 40x e 200x. Esta análise foi realizada por um único operador “cego” em relação ao grupo experimental, após este ter sido treinado e calibrado por um patologista. Para cada lâmina, toda extensão da lesão palatina foi observada, desde as margens epiteliais até a sutura palatina mediana. Os aspectos avaliados foram: presença de tecido de granulação, infiltrado inflamatório, proliferação celular, necrose e reabsorção da tábua óssea palatina, sequestro ósseo, colonização bacteriana, presença de osteoclastos e formação de fibras colágenas. A análise teve continuidade somente após haver concordância em relação ao reconhecimento das imagens e estruturas observadas entre o examinador e o patologista.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a reprodutibilidade intra-examinador dos dados obtidos através da mensuração macroscópica e histomorfométrica da lesão foram realizadas duas medidas com intervalo de 48h (Bland e Altman⁹³ 2010).

A comparação entre os diferentes grupos de tratamento foi obtida através da análise de variância de um critério (one-way ANOVA). Para comparar os resultados obtidos entre os grupos do estudo, primeiramente foi testado a normalidade dos dados obtidos através do teste de Shapiro-Wilks (amostra pequena $n=30$) e a equivalência das variâncias foi testada com o teste de Bartlett. Quando não houve distribuição normal e/ou equivalência das variâncias foi feita a transformação dos dados (logaritmo). Após a realização da ANOVA, quando obtidas diferenças significativas, as comparações múltiplas foram realizadas como o pós-teste de Tukey. Para comparar o peso inicial e final em cada grupo nos diferentes períodos experimentais foi realizado o teste T pareado. O nível de significância

adotado foi de 5% ($\alpha=0,05$). Todos os cálculos foram realizados com o programa estatístico GraphPad Prism 5.01.

5. RESULTADOS

Os animais do grupo controle apresentaram reduzido aumento de peso comparado aos demais grupos correspondentes ao período de 3 dias, sendo esta diferença estatisticamente significativa. No período de 7 dias, a significância estatística ocorreu somente entre o grupo controle e orabase. Nos demais períodos os animais continuaram a aumentar o peso corporal sem diferença estatística significativa entre os grupos (Gráfico 1).

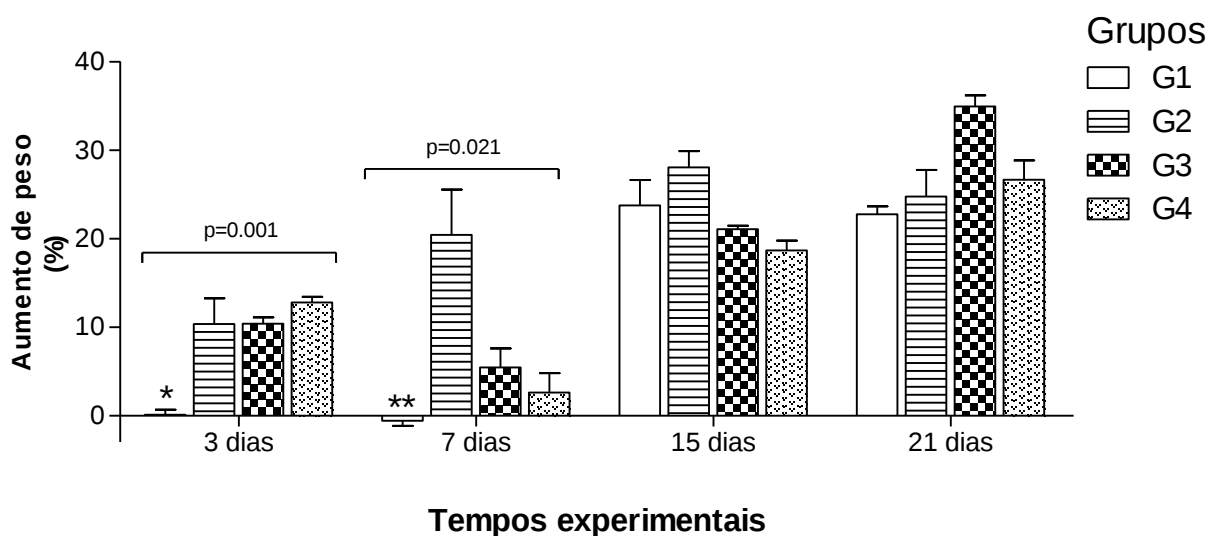


Gráfico 1. Percentual de aumento de peso dos animais durante os diferentes períodos experimentais. ANOVA com pós teste de Tukey. (*) diferença significativa ($p < 0,05$) no período de 3 dias com todos os grupos e no período de 7 dias somente com o G2.

5.1. ANÁLISE MACROSCÓPICA

O gráfico (Gráfico 1) mostra que o examinador estava calibrado no momento da mensuração da área macroscópica da lesão, pois os dados encontram-se dentro do limite de concordância e o viés (diferença das duas medidas) não foi diferente de forma significativa.

A única diferença significativa encontrada no período de 3 dias foi em relação à orabase comparado ao G0 (Gráfico 2), ou seja, à lesão inicial. No período de 7 dias a *Malva sylvestris* L. demonstrou ter sido mais efetiva em relação ao G0 (Gráfico 3). A avaliação de 15 e 21 dias apresentou o mesmo padrão de fechamento da lesão entre os grupos (Gráfico 4 e 5).

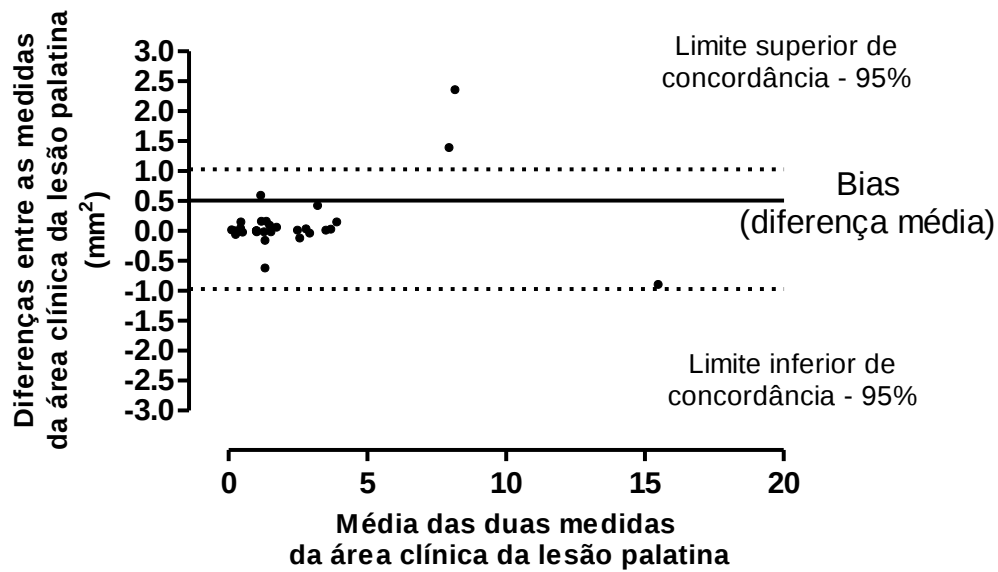


Gráfico 2. Reprodutibilidade intra-examinador dos dados da mensuração da medida da área da leão palatina (mm^2) obtidos em dois momentos com intervalo de 48 h. Método de Bland-Altman, valores dentro do limite de concordância. $p=0,2224$ em relação ao 0 hipotético (Teste t para uma amostra).

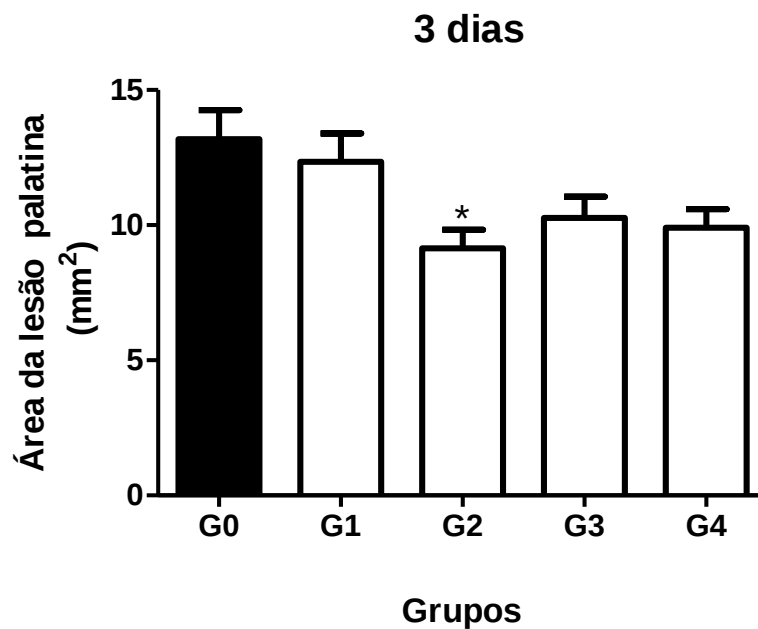


Gráfico 3. Média e erro padrão dos valores da área das lesões palatinas dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 3 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2-Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p>0,05$). (*) $p<0,05$, diferença significativa com o G0.

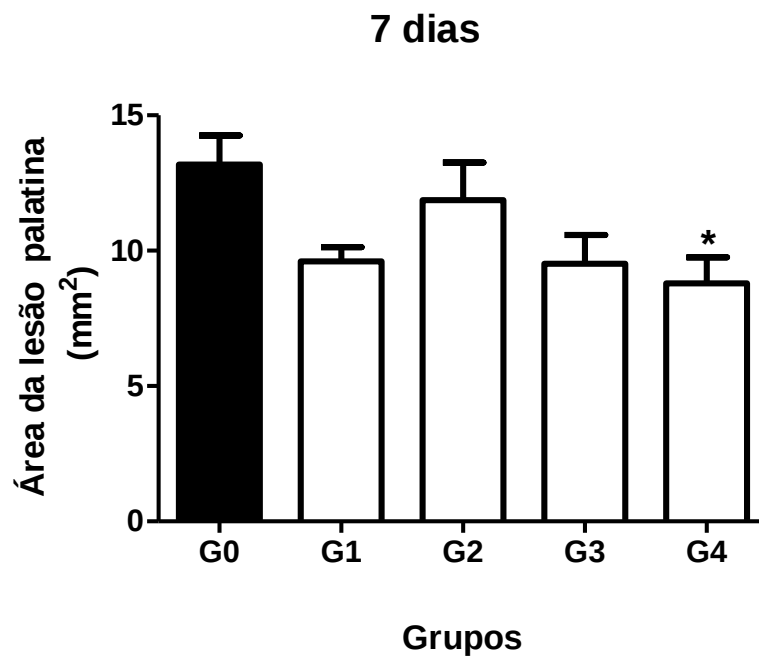


Gráfico 4. Média e erro padrão dos valores da área das lesões palatinas dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 7 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2-Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p>0,05$). (*) $p<0,05$, diferença significativa com G0.

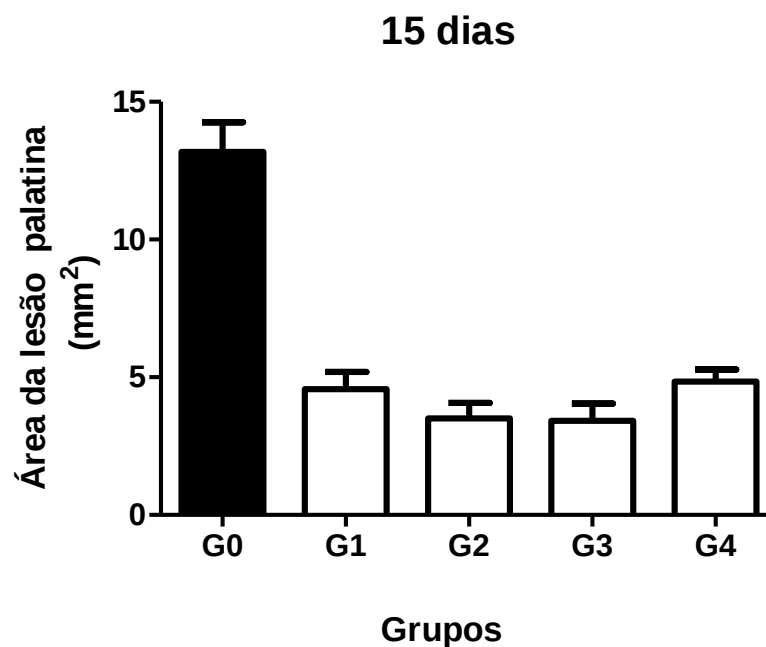


Gráfico 5. Média e erro padrão dos valores da área das lesões palatinas dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 15 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2-Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p>0,05$). $p<0,05$, diferença significativa de todos os grupos com o G0.

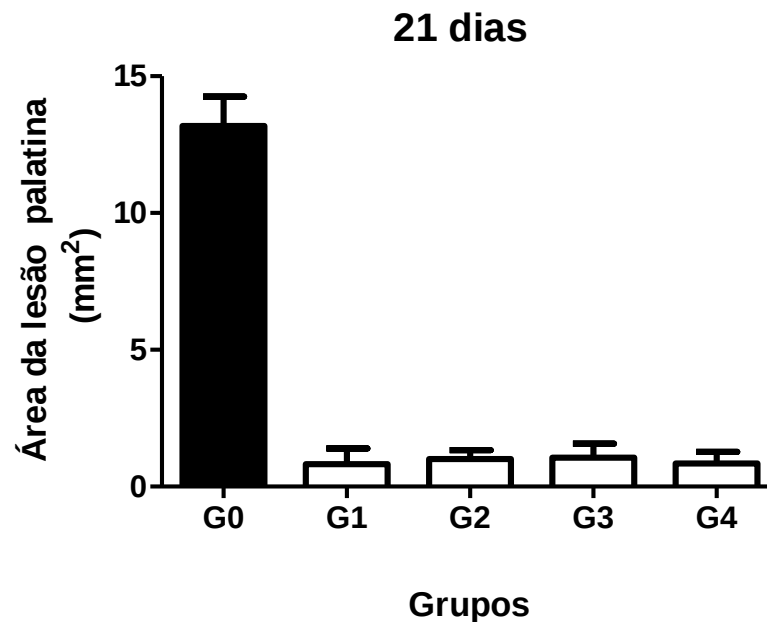


Gráfico 6. Média e erro padrão dos valores da área da lesão palatina dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 21 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2-Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p>0,05$). $p<0,05$, diferença significativa.

5.2. ANÁLISE HISTOMÉTRICA

O gráfico 6 demonstra que o examinador estava calibrado em virtude da concordância obtida no resultado.

A análise dos dados demonstrou atividade histológica de reparo da lesão somente a partir do 15º dia após o início dos tratamentos.

Houve diferença significativa em relação ao grupo controle e em função do tempo, porém, não houve diferença significativa entre os grupos tratados. Além disso, no período de 15 dias, o grupo da clorexidina 2% apresentou retardo no padrão de reparo comparado ao grupo controle.

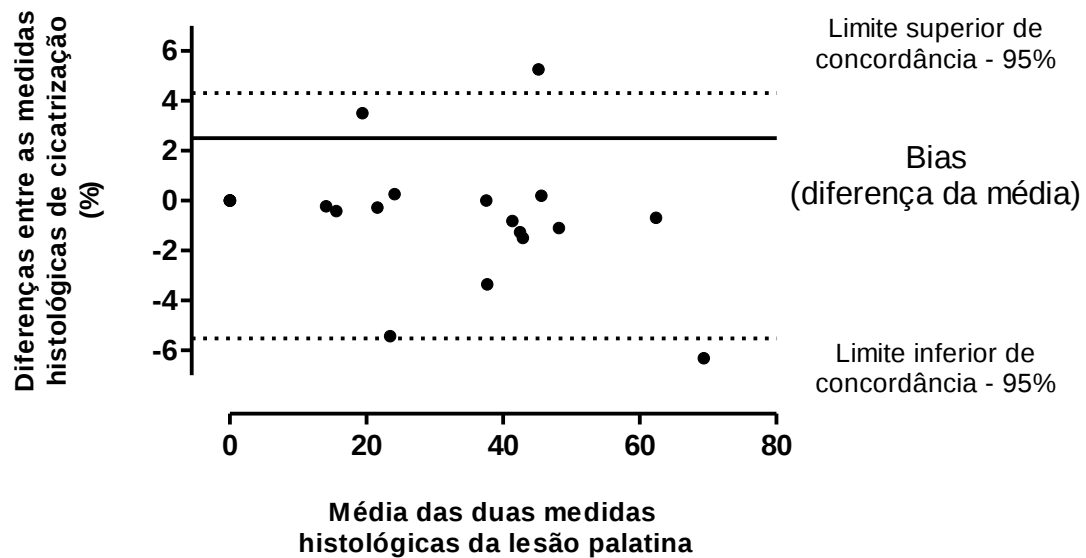


Gráfico 7. Reprodutibilidade intra-examinador dos dados da mensuração da distância histológica entre as margens da lesão palatina (%) obtido em dois momentos com 48 horas. Método de Bland-Altman, valores dentro do limite de concordância. $p = 0,9274$ em relação ao o hipotético (Teste t para uma amostra).

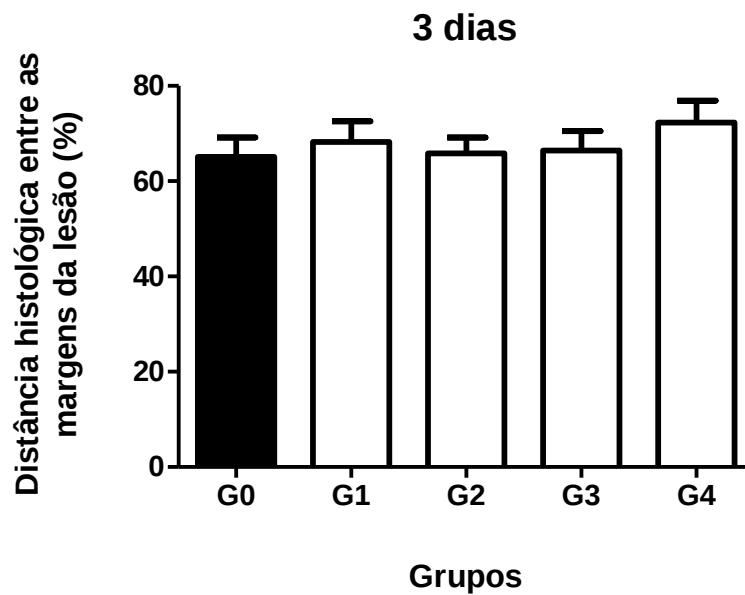


Gráfico 8. Média e erro padrão dos valores da área distância entre as margens da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 3 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2- Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa.

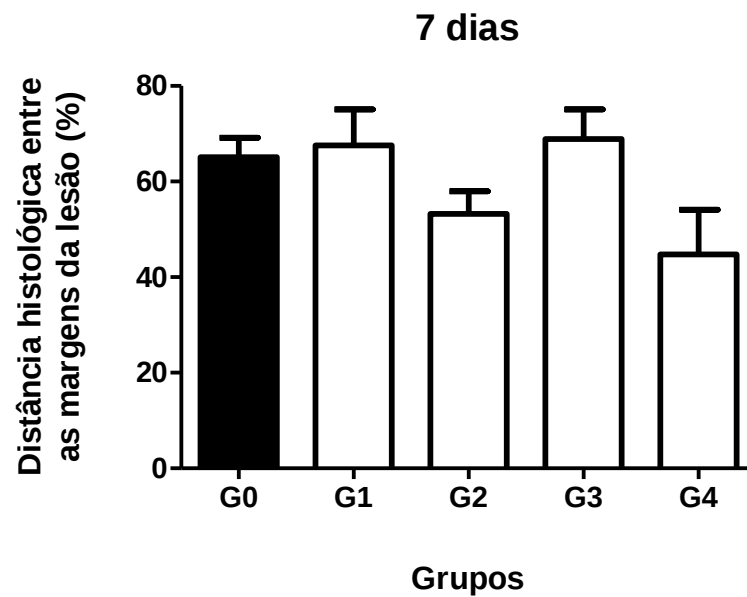


Gráfico 9. Média e erro padrão dos valores da área distância entre as margens da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 7 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2- Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa.

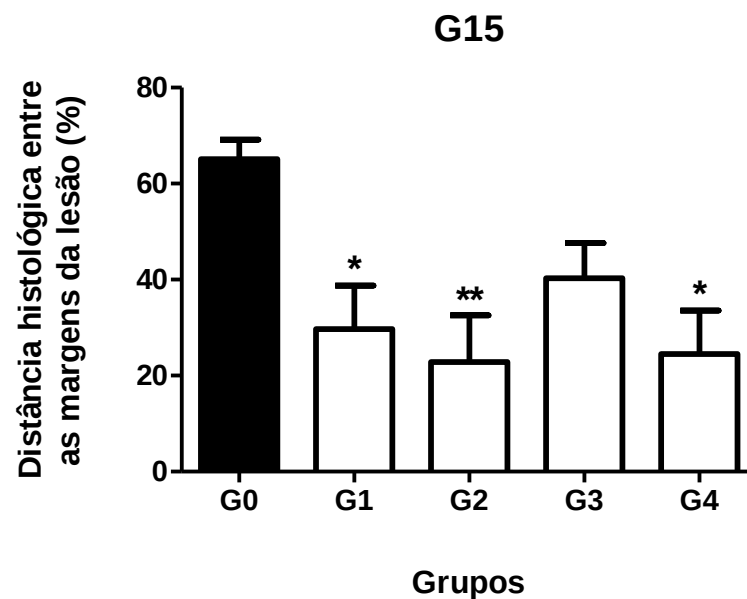


Gráfico 10. Média e erro padrão dos valores da área distância entre as margens da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 15 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2- Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p > 0,05$). Diferença significativa em relação ao G0. * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$).

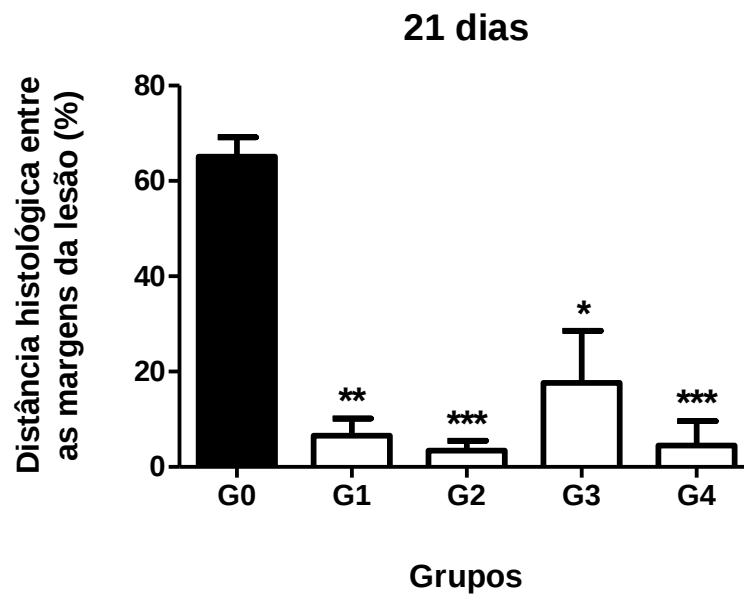


Gráfico 11. Média e erro padrão dos valores da área distância entre as margens da lesão (%) dos diferentes grupos de tratamento avaliados no período de 21 dias. G0- Lesão inicial, G1- Sem tratamento (controle), G2- Orabase, G3- Clorexidina 2% e G4- Malva 20%. ANOVA com pós teste de Tukey ($p > 0,05$). Diferença significativa em relação ao G0. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$).

ANÁLISE HISTOLÓGICA QUALITATIVA

Mucoperiosteo palatino normal

Foram visualizadas 4 camadas que recobriam o tecido ósseo palatino dos ratos, sendo: epitelial, lâmina própria, submucosa e o periosteio. O tecido epitelial visualizado foi do tipo escamoso estratificado ortoqueratinizado. As cristas epiteliais apresentavam-se encurtadas e sem discrepância em relação a sua altura. A lâmina própria era formada pela camada papilar que se estendia para o interior das cristas epiteliais cujas fibras colágenas eram frouxas e outra camada logo abaixo das margens epiteliais com fibras colágenas densas.

A camada submucosa era formada por extensa camada de fibras colágenas densas cercadas por fibroblastos, além de vasos sanguíneos e nervos maiores. Próximo ao feixe vâsculo-nervoso a característica das fibras colágenas era reticular.

Em íntima relação com o periósteo foi visualizada a camada osteogênica e sobre esta a camada de fibras. Na região da sutura palatina foi visualizado o tecido cartilaginoso que era circundado pela camada submucosa. Ao redor da sutura palatina foi observada a porção de tecido cartilaginoso bilateralmente circundado pela submucosa oriunda de toda extensão do periósteo. Acima da camada de tecido ósseo era possível visualizar o septo nasal.

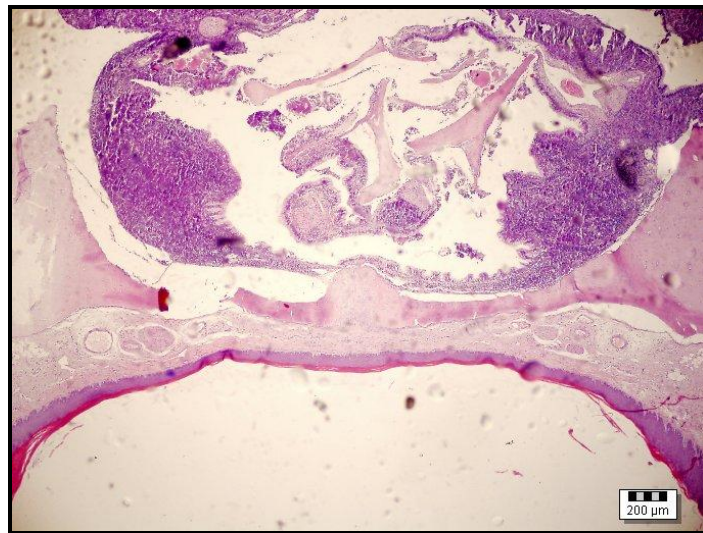


Figura 12. Corte histológico da região palatina demonstrando tecido epitelial íntegro (H.E. 40x).

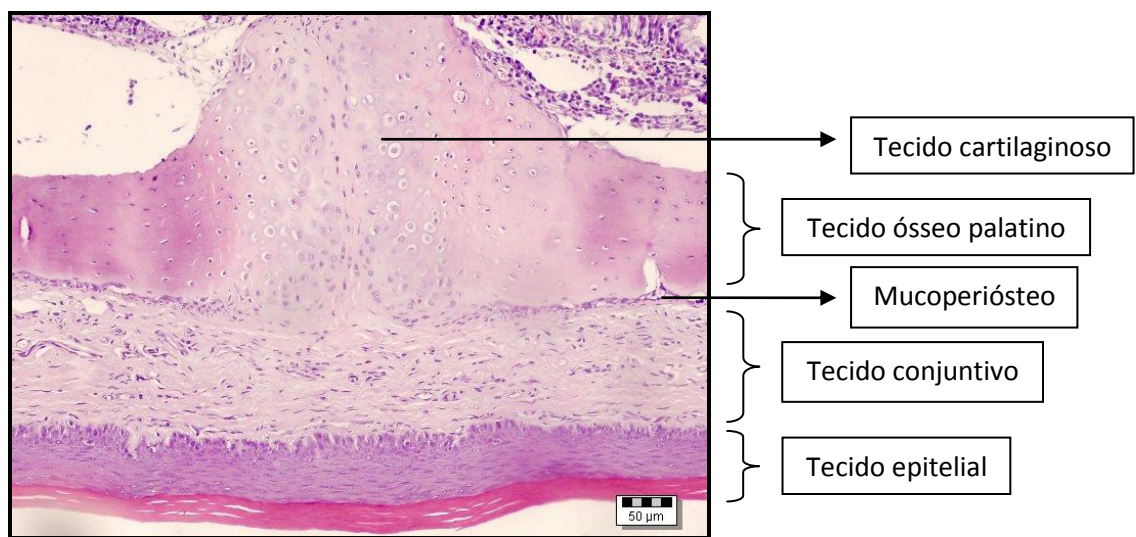


Figura 13. Epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado (H.E. 200x).

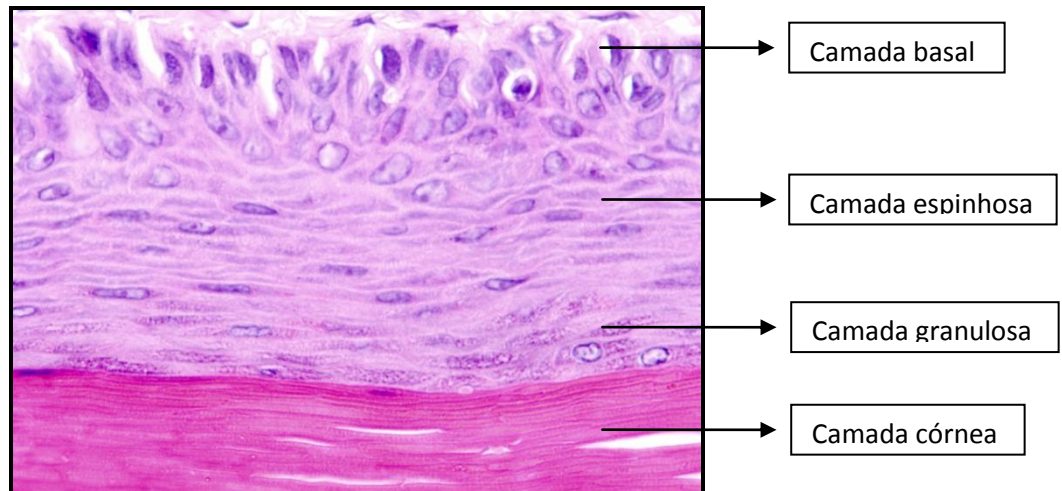


Figura 14. Camadas do epitélio escamoso estratificado ortoqueratinizado (H.E. 400x).

Três dias

As alterações observadas neste período foram semelhantes entre os grupos. Houve discreto início de proliferação das margens epiteliais entre o coágulo formado e o tecido ósseo palatino. O coágulo estava presente em pontos isolados e em maior frequência próximo às margens do tecido epitelial remanescente. Havia parte da tábua óssea exposta à cavidade bucal. Nesta região havia ausência de osteócitos no interior das lacunas sendo coberta por colônia bacteriana. O tecido de granulação estava presente somente em pontos isolados, principalmente próximos às margens da lesão apresentando início de proliferação celular. Foi observada a presença de alguns osteoclastos ao redor da tábua óssea em direção oposta à região de necrose óssea inicial. A maioria dos animais apresentou tecido ósseo palatino fragmentado. A única diferença aparente entre os grupos foi a camada de colônia bacteriana sobre o tecido ósseo desnudo, cuja extensão era discreta no grupo da clorexidina e da malva comparado aos demais.

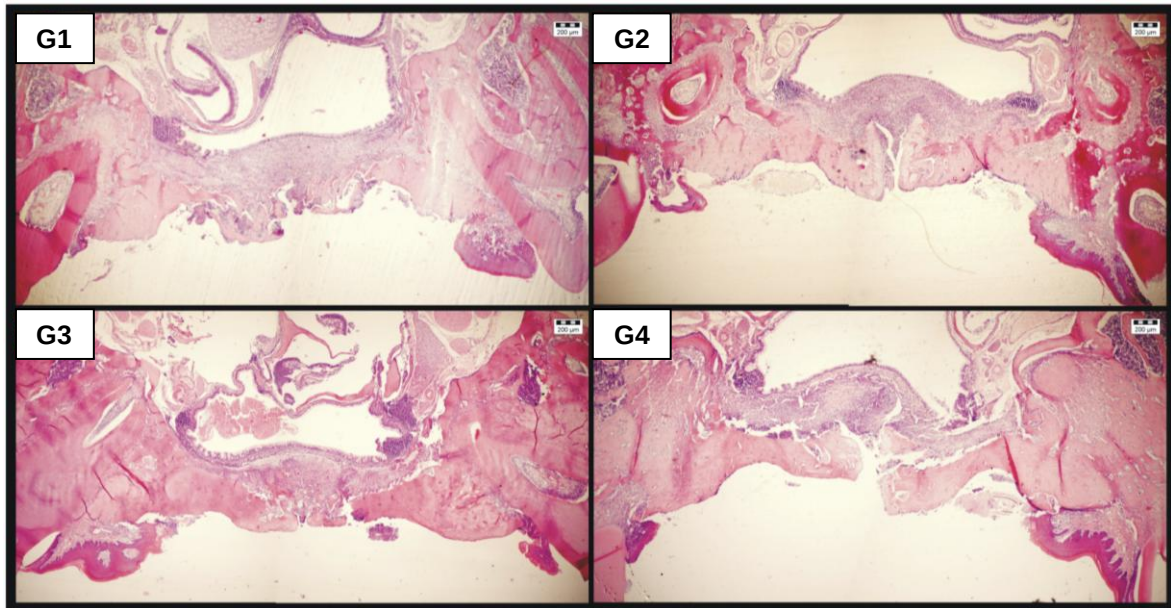


Figura 15. Período de 3 dias, G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 - Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).

Sete dias

A extensão da tabua óssea apresentava-se em continuidade ou fragmentada, porém, totalmente necrótica na região desnuda. Somente o G1 apresentou uma faixa de tecido ósseo com osteócitos aprisionados em lacunas. A extensão de colônia bacteriana sobre o tecido ósseo aumentou em todos os grupos, porém, em menor intensidade no G1 e G2. Também houve aumento da quantidade de osteoclastos sobre a extensão do tecido ósseo voltado para a cavidade nasal.

Neste período houve aumento da formação de tecido de granulação, da quantidade de infiltrado inflamatório e formação de vasos sanguíneos. A quantidade de fibroblastos aparentemente era mais abundante no G1. A epitelização apesar de ser ainda discreta, apresentava-se em proliferação.

Somente um animal do G1 apresentou completa formação do tecido epitelial. Neste animal o tecido ósseo estava completamente vitalizado com formação de tecido de granulação subjacente em abundância de células inflamatórias e vasos e menor quantidade de fibras colágenas. A lâmina própria e o mucoperiósteo eram visíveis.

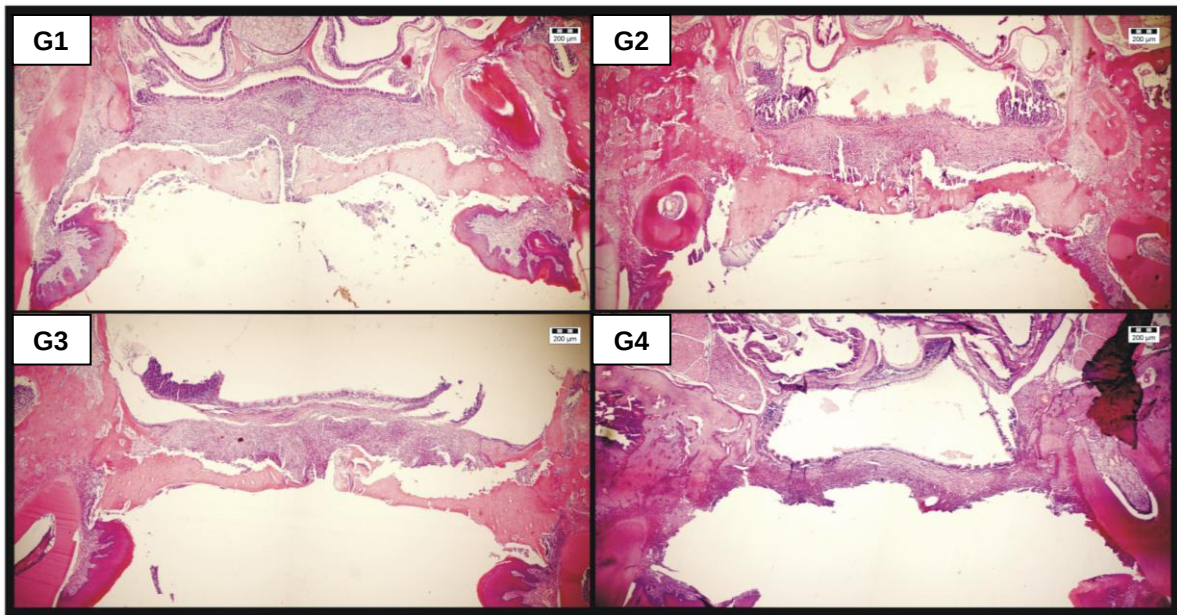


Figura 16. Período de 7 dias., G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 - Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).

Quinze dias

Houve aumento significativo do nível de epiteliação das margens em direção ao centro da ferida, porém, a área da ferida ainda era extensa nos cortes analisados. Ainda sobre este aspecto houve diferentes padrões de reparo neste período: alguns animais não apresentaram evolução de epiteliação, outros apresentaram total epiteliação ou nível de fechamento intermediário. Naqueles animais cuja epiteliação estava aquém, em maior aumento era possível visualizar uma camada de epitélio em formação, diferentemente do período pós-operatório de 7 dias, onde não havia sequer a camada de tecido de granulação sobre toda extensão desnuda.

A colonização bacteriana foi visualizada no G1 (controle), nos demais grupos era menor ou praticamente inexistente.

Raramente eram visualizados osteoclastos e o tecido ósseo apresentava-se totalmente reabsorvido ou em processo de formação de sequestro ósseo na maioria dos animais.

Extensa camada de tecido de granulação foi observada em todos os grupos, oriundos em sua maioria da cavidade nasal através da comunicação buco-sinusal e em menor parte das margens epiteliais remanescente. Quando o sequestro ósseo estava presente, o infiltrado inflamatório era visualizado. As fibras colágenas,

quando visualizadas próximas ao tecido epitelial, apresentavam-se dispersas e em direções variadas. Também foi observado grande quantidade de vasos sanguíneos e nervos. Próximos a estes a fibras apresentavam-se dispersas.

O G4 possuía maior quantidade de tecido ósseo palatino comparado ao G2 onde praticamente era ausente. Quanto maior era a quantidade de tecido ósseo necrótico remanescente, menor era o tecido epitelial neoformado.

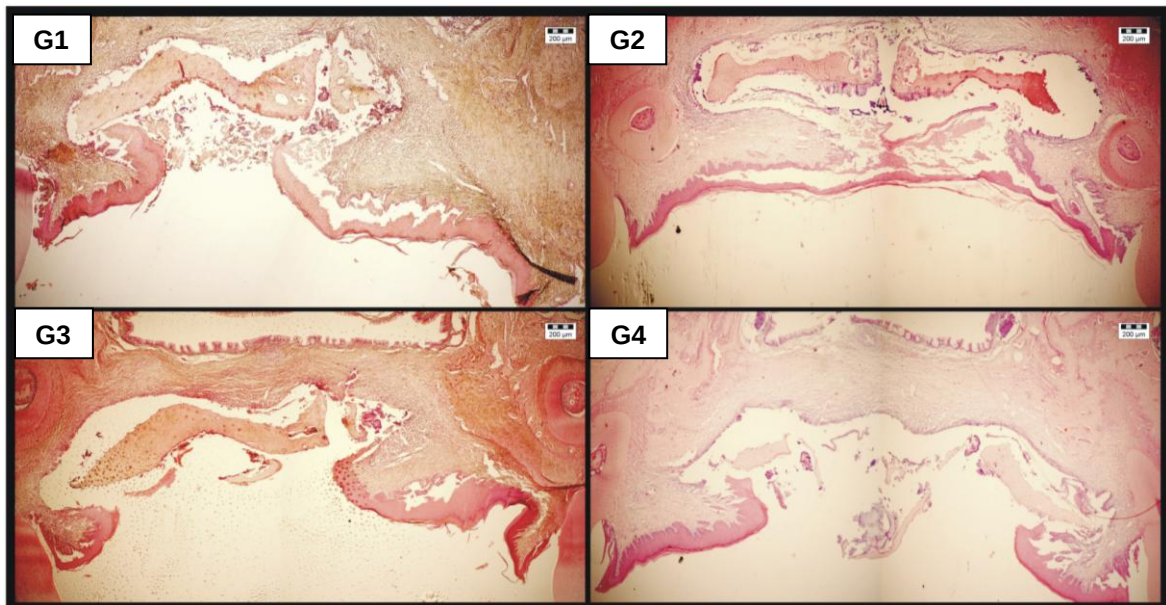


Figura 17. Período de 15 dias. G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 - Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).

Vinte e um dias

O tecido epitelial neoformado estava presente em toda extensão da ferida das amostras deste período apresentando todas as camadas cujas cristas epiteliais eram elevadas. Nos espaços em que estavam ausentes era possível observar em aumento maior a formação de queratinócitos em mitose. Em poucas amostras deste período havia tecido ósseo necrótico. Quando presente eram praticamente englobados pelo tecido epitelial neoformado, formando seqüestro ósseo e neste caso, havia a presença de colonização bacteriana e infiltrado inflamatório.

Aparente redução da quantidade de células no tecido de granulação comparado aos períodos de 7 e 15 dias foi observado. As células eram visualizadas em maior quantidade diante dos casos onde havia a presença de seqüestro ósseo.

As fibras colágenas visualizadas eram mais densas na camada mais profunda do tecido conjuntivo e menos densas nas proximidades do tecido epitelial na maioria das imagens analisadas.

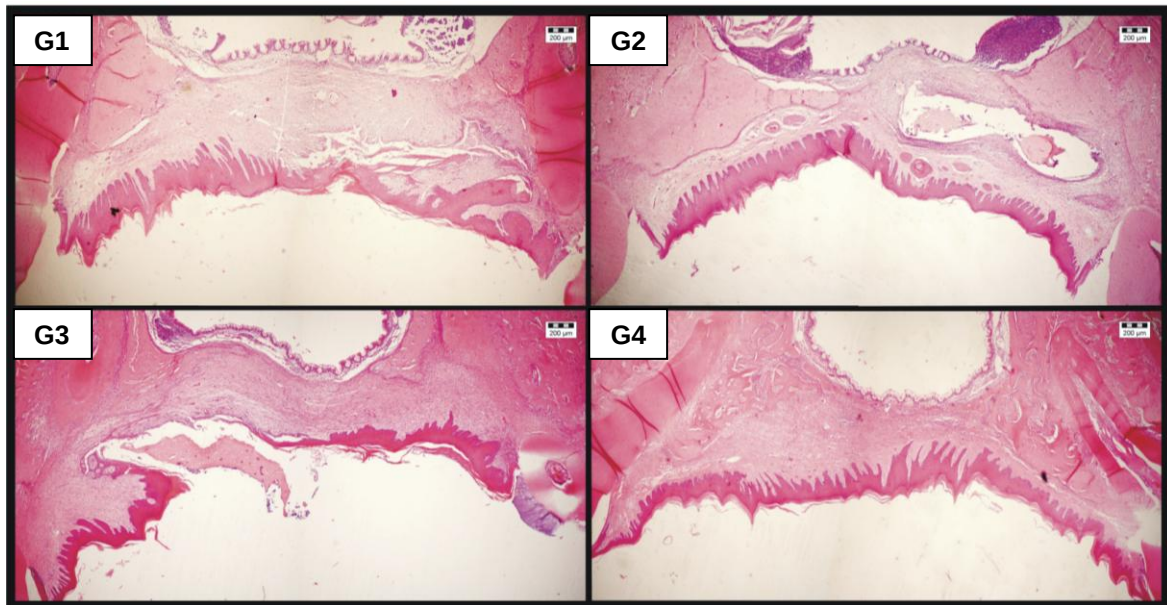


Figura 18. Período de 21 dias. G1 – Controle; G2 – Orabase; G3 - Clorexidina 2%; G4 – Malva 20% (H.E. 40x).

6. DISCUSSÃO

A *Malva sylvestris* L. é uma planta que vem sendo amplamente utilizada pela população leiga nos cuidados relacionados à processos infecciosos e inflamatórios. Em odontologia, muitos pacientes relatam a utilização tópica, na forma de bochechos para a cura de estomatites, gengivites e pulpites e pós-operatório. Este uso empírico associado ao incentivo da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization – WHO) instigou pesquisadores da área de atenção à saúde a desenvolver diversos projetos de investigação científica sobre a constituição da planta assim como suas propriedades terapêuticas (Billeter et al.⁵ 1990, Redzic et al.⁶ 2005, Classen e Blaschek³⁹ 1998, Farina et al.⁴⁰ 1995, Cutillo et al.⁴¹ 2006, Conforti et al.⁴² 2008, Cheng e Wang⁴⁷ 2006, Chiclana et al.⁴⁸ 2009, Barros et al.⁴⁹ 2010, Buffon et al.⁵⁰ 2001, Guarrera⁵² 2005, Billeter et al.⁹⁴ 1991, Classen e Blaschek⁹⁵ 2002, Guarrera et al.⁹⁶ 2005).

Segundo a Academia Americana de Periodontia, um processo de cicatrização envolve a formação de um tecido fibroso como consequência de uma lesão previamente provocada, deixando no local injuriado uma alteração clínica que é a cicatriz. O reparo e a regeneração ao contrário referem-se à cura ou resolução de uma lesão (Periodontology⁹⁷ 2001). Neste caso, o termo correto a ser utilizado é reparo, pois não há formação de cicatriz após lesões em mucosa bucal.

Há diversas formas de agressões que induzem a formação de lesões intra-bucais como estomatites, extrações dentais, implantes, cirurgias e tratamentos periodontais. A resolução da ferida ou reparo na cavidade bucal, sempre está sujeita a um prolongamento da fase inflamatória em virtude de extensa colonização bacteriana e eventuais traumas (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006). Portanto, encontrar um agente que promova ou acelere a resolução de lesões por segunda intenção, reduzindo complicações pós-operatórias seria fundamental na área odontológica.

O modelo de lesão palatina adotado nesta pesquisa foi baseado na facilidade de padronização da técnica em relação à extensão (formato circular) e profundidade (remoção do mucoperiósteo até a completa exposição da tábua óssea palatina) da confecção da lesão com o bisturi circular o que favorece resultados com menor viés e maior segurança, podendo-se assegurar que estas lesões nos grupos

que receberam tratamento não prejudicaram o bem-estar animal, uma vez que não houve perda de peso, como demonstrado após análise estatística. Ao contrário os animais continuaram a ganhar peso com o passar do tempo. Em alguns estudos utilizando a mesma metodologia os autores adotaram o bisturi circular de 3 mm (Hammad et al.⁶⁰ 2011, Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999, Cornelissen et al.⁷⁹ 2000, Cornelissen et al.⁹⁸ 2000, Cornelissen et al.⁹⁹ 2002) outro com 4 mm (Oda et al.¹⁰⁰ 2004) e também com 5 mm (Kozlovsky et al.⁵⁹ 2007). Neste estudo a escolha do bisturi circular de 4 mm foi baseado em estudo piloto, onde foi observado que o fechamento da lesão de 3 mm de diâmetro ocorria até o 9 dia, conforme resultados do estudo de Cornelissen et al (Cornelissen et al.⁶¹ 1999). Neste caso a observação do reparo em período de tempo maior foi o critério de escolha do tamanho da lesão. Além disso, a realização do modelo cirúrgico em ratos ocorreu devido à facilidade de manuseio e relativo baixo custo de manutenção (Cornelissen et al.⁷⁹ 2000, Cornelissen et al.⁹⁸ 2000). A aplicação das substâncias pertencentes a cada grupo foi iniciada somente após 24 horas. Neste período ocorre a formação do coágulo e deposição da camada de fibrina sobre o tecido ósseo palatino, considerada fundamental para a neoformação de tecido conjuntivo e tecido epitelial no local da injúria por preservar as margens epiteliais e as células do tecido conjuntivo e liberar próximo às margens fatores de crescimento (Nanci e Ten Cate⁵³ 2008, Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999, Li et al.⁶³ 2007, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Broughton et al.⁶⁸ 2006). Além disso, este intervalo de tempo é importante para a recuperação do animal após a indução de formação da lesão palatina (Kozlovsky et al.⁵⁹ 2007).

Outro detalhe importante foi a opção por não anestesiarem os animais previamente a cada uma das aplicações diárias das substâncias. Quando realizamos a aplicação tópica intrabucal de qualquer medicamento dificilmente ocorrerá a permanência deste sobre o local injuriado por longo período de tempo. Há uma movimentação dinâmica e remoção da substância pela saliva e através da articulação dos dentes, músculos e da língua durante a fala e deglutição. A ação exercida por soluções, como bochecho com clorexidina ocorre em virtude do seu efeito residual sobre a superfície epitelial exercida pela sua elevada substantividade (Jones¹⁰¹ 1997). Além de aproximar ainda mais de uma situação clínica real, não houve risco de perda de animais durante os períodos experimentais.

O padrão de reparo ocorreu em função do tempo, porém, sem diferença significativa entre os grupos na maioria dos tempos. A semelhança entre os grupos que receberam alguma forma de recobrimento da lesão demonstra a importância em se prevenir a colonização bacteriana e amenizar o impacto das agressões físicas provocadas pela alimentação e químicas diretamente no local da injúria, pois os melhores resultados observados foram em relação ao G2 (veículo orabase) e G4 (malva a 20% em orabase). Como a orabase forma uma película protetora sobre a lesão pode ter favorecido o reparo nos período de 15 e 21 dias nos grupos G2 e G4 por exercer ação mecânica protetora (Langlois e Devildos¹⁰² 1974). Como os resultados entre o G2 e G4 foram semelhantes entre si e não foram diferentes de forma significativa do G3 (Clorexidina 2%) e G1 (Controle) não há como afirmar que a *Malva sylvestris* teve efeito positivo na redução da extensão da lesão. Provavelmente ocorreu em virtude da proteção exercida pela orabase e não pelas propriedades farmacológicas exercidas por seus metabólitos ativos presentes nas folhas e flores. Porém, outros estudos devem ser conduzidos para certificar este efeito com outros veículos e com extratos em diferentes concentrações.

O veículo incorporado à *Malva sylvestris* L. poderia ter sido substâncias na forma de gel como se encontra disponível comercialmente a clorexidina, porém, a orabase não é tóxica, não agride os tecidos aos quais permanece em contato, é aderente quando comparado ao gel, o que mantém as concentrações da substância ativa em maior período de tempo possível sobre a ferida, variando de 15 minutos a 2 horas, dependendo da mobilidade da região afetada e da salivação que remove mais facilmente quanto maior for o fluxo (Kutscher et al.¹⁰³ 1959, Petelin et al.¹⁰⁴ 1998).

Uma das substâncias incluídas neste estudo foi o digluconato de clorexidina a 2% em natrosol, um gel à base de hidroxietilcelulose. Além de ser considerado o padrão ouro no controle de colonização e proliferação bacteriana é a substância de escolha para a utilização após procedimentos cirúrgicos, como cirurgias periodontais e de implantes osteointegráveis em virtude do seu amplo espectro de ação (Jones¹⁰¹ 1997). Neste grupo não foi utilizada a orabase porque este veículo não promove a dissociação e liberação da clorexidina interferindo em sua ação, optando-se pelo o natrosol. A clorexidina na concentração de 2% foi utilizada, pois é empregada na forma tópica após os procedimentos cirúrgicos na cavidade bucal.

No período de 15 dias a clorexidina apresentou efeito negativo comparado ao G0, sem diferença significativa dos demais grupos no mesmo período. Esta redução do padrão de reparo da lesão reflete o efeito nocivo causado pela substância sobre a proliferação de fibroblastos e consequentemente de substâncias colágenas e não-colágenas, assim como de queratinócitos (Hidalgo e Dominguez¹⁰⁵ 2001, Mariotti e Rumpf¹⁰⁶ 1999, Damour et al.¹⁰⁷ 1992, Pucher e Daniel¹⁰⁸ 1992, Cline e Layman¹⁰⁹ 1992). De acordo com estes autores, a inibição da proliferação e da função dos fibroblastos in vitro depende do tempo e da concentração da clorexidina sobre o tecido lesionado. Como a concentração utilizada neste estudo foi elevada, o resultado foi contraditório ao estudo que comparou lesões palatinas de 5 mm com tratamento de clorexidina a 0,12% e a 1%, onde o efeito sobre o reparo foi benéfico (Kozlovsky et al.⁵⁹ 2007, Hammad et al.⁶⁰ 2011).

O trauma mecânico e físico causado pela mastigação foi um possível fator que promoveu o retardo do processo de reparo. Acredita-se que a ausência do coágulo no grupo de 3 dias, deve-se ao atrito provocado pela ração contra a lesão palatina. A ausência das margens epiteliais que também foi detectado em alguns animais e consequentemente a ausência dos fatores de crescimento (PDGF, TGF- β e PAF) e prejudica a velocidade de neoformação de tecido epitelial e conjuntivo por prolongar a fase inflamatória, reduzir o número de células que induzem a neoformação tecidual e de fatores de crescimento (Cornelissen et al.⁶¹ 1999, Cornelissen et al.⁶² 1999, Witte e Barbul⁶⁵ 1997, Martin⁶⁶ 1997, Singer e Clark⁶⁷ 1999, Broughton et al.⁶⁸ 2006). Porém, não foi realizada análise imunohistoquímica para detectar quantitativamente a presença de tais fatores por não se tratar do objetivo deste estudo.

Outra possível consequência do trauma da mastigação, desta vez associada à colonização bacteriana, foi a necrose da tábua óssea palatina exposta ao meio bucal. Este foi um achado comum a outro experimento semelhante (Kozlovsky et al.⁵⁹ 2007). Embora não tenha sido avaliado quantitativamente, observou-se a presença de osteoclastos principalmente nos períodos de 7 e 15 dias. Estes fatores provocam um prolongamento da fase inflamatória por perpetuar o fluxo contínuo de células inflamatórias para o local da injúria. Células como neutrófilos e macrófagos e também queratinócitos e fibroblastos nestas condições produzem e liberam para o local metaloproteinases causando um desequilíbrio entre a atividade

proteolítica e a neoformação tecidual retardando o processo de resolução da lesão (Witte e Barbul⁶¹ 1997, Martin⁶² 1997, Singer e Clark⁶³ 1999, Broughton et al.⁶⁴ 2006). Além disso, a fase inflamatória deste processo exige grande consumo de oxigênio gerando espécies de oxigênio reativos (ROS) e radicais livres que reduzem a concentração de fatores de crescimento e inibidores de proteinases (Battino et al.¹¹⁰ 1999), sendo as células do epitélio gengival altamente sensíveis ao efeito das espécies de oxigênio reativos derivados de polimorfonucleares (Altman et al.¹¹¹ 1992).

Apesar dos resultados terem demonstrado que o extrato de *Malva sylvestris* Linn não promoveu o aceleração do reparo da lesão, não foi observado resultados negativos ou efeitos prejudiciais aos tecidos e à saúde sistêmica dos animais. Como há diversos estudos in vitro que comprovam o potencial fitoterápico da malva, demonstrando que esta planta medicinal pode ser promissora nos cuidados relacionados à saúde bucal, deve-se dar continuidade às pesquisas com diferentes veículos e concentrações para testar sua efetividade não somente como cicatrizante, mas também pelo seu potencial antiinflamatório e antimicrobiano.

7. CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada foi possível concluir que:

- macroscopicamente houve redução significativa da ferida em função do tempo.
- o extrato de *Malva sylvestris* L. a 20% em orabase não apresentou efeito no reparo de feridas em mucosa palatina de ratos.

REFERÊNCIAS*

1. World health organization. Traditional medicine. 2008. Acesso em 12/07/2011. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en>.
2. Barros L, Duenas M, Carvalho AM, Ferreira IC, Santos-Buelga C. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. Food Chem Toxicol. 2012 Feb 11;50(5):1576-82.
3. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Med and Biol Res. 2000;33:179-89.
4. Gasparetto JC, Martins CA, Hayashi SS, Otuky MF, Pontarolo R. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. J Pharm Pharmacol. 2012 Feb;64(2):172-89.
5. Billeter M, Meier B, Sticher O. 8-Hydroxy Flavonoid glycosides from *Malva sylvestris*. J Phytochem. 1990;8:464-9.
6. 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.
7. Castilho A, Murata R, Pardi V. Produtos Naturais em Odontologia. Rev Saúde. 2007;1(1):11-9.
8. Lima Junior J, Dimenstein M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: visão do odontólogo. Rev Saúde. 2006;8(19):37-44.
9. Calixto J. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz J Med and Biol Res. 2000;33:179-89.
10. Franscico K. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. Rev Saúde. 2010;4(1):18-24.

*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. Marchese J, Broetto F, Ming LC. Perfil dos consumidores de plantas medicinais e condimentares do município de Pato Branco (PR). *Hortic. Bras.* 2004;Abr/Jun; 22(2):332-5.
13. Medeiros M, Fonseca V, Andreato R. Plantas medicinais e seus usos pelos sítios da Reserva Rio das Pedra, Mangaratiba. *Acta Bot. Bras.* 2004;18(2):391-9.
14. BRASIL. Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado. 2008. Acesso em 12/01/2012. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
15. Herbarium. 2012. Acesso em 12/01/2012. <http://www.herbarium.net>
16. Lorenzi H, Abreu Matos F. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum. 2008.
17. Carvalho A, Balbino E, Maciel A, Perfeito J. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2008;abril/jun;18(2):314-9.
18. BRASIL. Definição de medicamentos fitoterápicos. 2004. Acesso em 11/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
19. Ameh S, Obodozie O, Inyang U, Abubakar M, Garba M. Current phytotherapy-A perspective on the science and regulation of herbal medicine. *J Med Plants Res.* 2010;4(2):72-81.
20. BRASIL. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2007. Acesso em 11/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
21. BRASIL. Resolução RDC nº 48 “o registro de medicamentos fitoterápicos”. 2004. Acesso em 11/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
22. BRASIL. Resolução RE nº 88 "Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia dos fitoterápicos". 2004. p. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
23. BRASIL. Resolução RE nº 89 “Lista de Registro Simplificado de Fitoterápicos”. 2004. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.

24. BRASIL. Resolução RE nº 90 "Guia para a realização de estudos de Toxicidade pré-clínica de fitoterápicos". 2004. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
25. BRASIL. Resolução RE nº 91 "Guia para realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamentos pós-registro de Fitoterápicos". 2004. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
26. BRASIL. Decreto nº 5.813 "Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos" 2006. Acesso em 11/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
27. BRASIL. Resolução RDC nº 95 "Texto de bula de medicamentos fitoterápicos". 2008. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
28. BRASIL. Instrução Normativa nº 5 "Lista de medicamentos de fitoterápicos de registro" 2008. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
29. BRASIL. Instrução Normativa nº 6 "Guia para notificação de lotes-piloto de medicamentos" 2007. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
30. Neto EM, Shuqair N, Balbino EE, Carvalho A. Comentários sobre o registro de fitoterápicos. Revista Fitos. 2006;1(3):9-17.
31. Carvalho A, Nunes D, Baratelli T, Shuqair N, Netto E. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amazônia. 2007;5(11):26-32.
32. BRASIL. Esclarecimento do dia 29 de novembro de 2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2010. Acesso em 29/07/2011. <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>.
33. Panizza S. Como prescrever ou recomendar plantas medicinais. Maranhão. ed: CONBRAFITO; 2010.
34. Oliveira F, Gobira B, Guimarães C, Lima K. Espécies vegetais indicadas na odontologia. Rev Bras Farmacogn. 2007;jul-set;17(3):466-76.
35. Soyama P. Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas. Cienc Cult. 2007;59:12-3.

36. Groppo FC, Bergamaschi CC, Cogo K, Franz Montan M, Motta RHL, Andrade ED. Use of phytotherapy in dentistry. *Phytother Res.* 2008;22(8):993-8.
37. Santos E, Dantas G, Santos H, Diniz M, Sampaio F. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2009;19(1b):321-4.
38. Alonso J. Tratado de Fitomedicina. Buenos Aires: Ed. Isis; 1998.
39. Classen B, Blaschek W. High molecular weight acidic polysaccharides from *Malva sylvestris* and *Alcea rosea*. *Planta Med.* 1998;Oct;64(7):640-4.
40. Farina A, Doldo A, Cotichini V, Rajevic M, Quaglia M, Mulinacci N et al. HPTLC and reflectance mode densitometry of anthocyanins in *Malva sylvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 1995;Dec;14(1-2):203-11.
41. Cutillo F, D'Abrosca B, DellaGreca M, Fiorentino A, Zarrelli A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry.* 2006;67(5):481-5.
42. Conforti F, Sosa S, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D et al. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. *J Ethnopharmacol.* 2008;116(1):144-51.
43. Coelho de Souza G, Haas A, Von Poser G, Schapoval E, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2004;90(1):135-43.
44. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of certain plants used in Turkish traditional medicine. *Asian J. Plant Sci.* 2004;3(1):104-7.
45. Asolini F, Tedesco A, Carpes S. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. *Braz. J. Food Technol.* 2006;jul./set.;9(3):209-15.
46. Magro A, Carolino M, Bastos M, Mexia A. Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Rev Iberoam Micol.* 2006;Sep;23(3):176-8.
47. Cheng C, Wang Z. Bacteriostatic activity of anthocyanin of *Malva sylvestris*. *Forestry.* 2006;17(1):83-5.

48. 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;28(2):275-8.
49. Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: A comparative study of the nutraceutical potential and composition. Food and Chem Toxicol. 2010;48(6):1466-72.
50. Buffon MCM, Lima MLC, Galarda I, Cogo L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calendula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo" in vitro. Rev Vis Acad. 2001;2(1):31-8.
51. Marouane W, Soussi A, Murat JC, Bezzine S, El Feki A. The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. Lipids Health Dis. 2011;10(1):65.
52. Guarrera PM. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). Fitoterapia. 2005 Jan;76(1):1-25.
53. Nanci A, Ten Cate AR. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function: Mosby Inc; 2008.
54. Peterson L. In: Peterson LJ, Ellis E, Hupp JR, Tucker MR. Cirurgia Oral e Maxilofacial Contemporânea. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
55. Nemcovsky CE, Artzi Z, Moses O, Gelernter I. Healing of dehiscence defects at delayed-immediate implant sites primarily closed by a rotated palatal flap following extraction. Int J Oral Maxillofac Implants. 2000;15(4):550.
56. Farnoush A. Techniques for the protection and coverage of the donor sites in free soft tissue grafts. J Periodontol. 1978;49(8):403.
57. Del Pizzo M, Modica F, Bethaz N, Priotto P, Romagnoli R. The connective tissue graft: a comparative clinical evaluation of wound healing at the palatal donor site. J Clinic Periodontol. 2002;29(9):848-54.
58. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. J Dent Res. 2010;89(3):219.

59. Kozlovsky A, Artzi Z, Hirshberg A, Israeli Tobias C, Reich L. Effect of local antimicrobial agents on excisional palatal wound healing: a clinical and histomorphometric study in rats. *J Clin Periodontol*. 2007;34(2):164-71.
60. Hammad H, Hammad M, Abdelhadi I, Khalifeh M. Effects of topically applied agents on intra oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study *Int J Dent Hyg*. 2011;Feb;9(1):9-16.
61. Cornelissen AMH, Maltha JC, Von den Hoff HW, Kuijpers Jagtman AM. Palatal mucoperiosteal wound healing in the rat. *Eur J Oral Sci*. 1999;107(5):344-51.
62. Cornelissen AMH, Von den Hoff JW, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Effects of interferons on proliferation and collagen synthesis of rat palatal wound fibroblasts. *Arch Oral Biol*. 1999;44(7):541-7.
63. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. 2007;25(1):9-18.
64. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clinf North Am*. 1997;77(3):509-28.
65. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):509-28.
66. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*. 1997;276(5309):75.
67. Singer AJ, Clark R. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.
68. Broughton GII, Janis JE, Attinger CE. The basic science of wound healing. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7S):12S-34S.
69. Broughton GII, Janis JE, Attinger CE. Wound healing: an overview. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(7S):1e.
70. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J*. 2006;20(13):2366.

71. Artuc M, Hermes B, Stckelings U, Grützkau A, Henz B. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing—active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol*. 1999;8(1):1-16.
72. Noli C, Miolo A. The mast cell in wound healing. *Vet Dermatol*. 2001;12(6):303-13.
73. Zeinoun T, Aftimos G, Bou Saba S, Nammour S. Eosinophils and mastocytes in healing laser excision wounds. *Lasers Med Sci*. 2009;May;24(3):307-12.
74. Maurer M, Opitz M, Henz BM, Paus R. The mast cell products histamine and serotonin stimulate and TNF-[alpha] inhibits the proliferation of murine epidermal keratinocytes in situ. *J Dermatol Sci*. 1997;16(1):79-84.
75. Clark RAF. The molecular and cellular biology of wound repair: Springer Us; 1996.
76. Szpaderska A, Zuckerman J, DiPietro L. Differential injury responses in oral mucosal and cutaneous wounds. *J Dental Res*. 2003;82(8):621.
77. Van Beurden H, Von den Hoff J, Torensma R, Maltha J, Kuijpers-Jagtman A. Myofibroblasts in palatal wound healing: prospects for the reduction of wound contraction after cleft palate repair. *J Dental Res*. 2005;84(10):871.
78. Funato N, Moriyama K, Baba Y, Kuroda T. Evidence for apoptosis induction in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. *J Dental Res*. 1999;78(9):1511.
79. Cornelissen AMH, Stoop R, Hoff HW, Maltha JC, Kuijpers Jagtman AM. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(1):1-7.
80. Farmacopéia Brasileira. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000.
81. World health organization. Quality control methods for medicinal plant material. 1998. Acesso em 27/09/2011. http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/quality_assurance/control/en/.
82. Ferreira A. Guia prático da farmácia magistral. 2ª ed. Juiz de Fora; 2002.
83. Appel G, Réus M. Formulações aplicadas à Odontologia. São Paulo: RCN; 2003.

84. Ferreira A. Discussão de critérios para determinação de prazo de validade em preparações magistrais. *Rev ANFARMAG*. 2001;30:35-41.
85. Pelczar J, Chan E, KRIEG N. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2ª ed: Makron Books; 1996.
86. Thompson JE, Davidow LW. *A practical guide to contemporary pharmacy practice*. 2ª ed. São Paulo: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
87. BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Siretoria Colegiada (RDC) nº 33, de 19 de abril de 2000. Regulamenta as boas práticas de manipulação de medicamentos em farmácias, além de trazer como anexo, o roteiro de inspeção para farmácias.
88. Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório. *Animais de Laboratório SBCAL-COBEA*; 2011. p. Acesso em 14/09/2011. www.cobea.org.br.
89. Mezdari T, Tomás V, Amaral V. *Animais de laboratório: cuidados na iniciação e experimentação*. Florianópolis: UFSC; 2004.
90. Kahnberg KE, Thilander H. Healing of experimental excisional wounds in the rat palate:(I) Histological study of the interphase in wound healing after sharp dissection. *Int J Oral Surg*. 1982;11(1):44-51.
91. Seymour G, Romaniuk K, Newcomb G. Effect of citric acid on soft tissue healing in the rat palate. *J Clin Periodontol*. 1983;10(2):182-7.
92. Wagener FA, van Beurden HE, von den Hoff JW, Adema GJ, Figdor CG. The heme-heme oxygenase system: a molecular switch in wound healing. *Blood*. 2003;102(2):521.
93. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Int J Nurs Stud*. 2010;Aug;47(8):931-6.
94. Billeter M, Meier B, Sticher O. 8-hydroxyflavonoid glucuronides from *Malva sylvestris*. *Phytochemistry*. 1991;30(3):987-90.
95. Classen B, Blaschek W. An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*. *Planta Med*. 2002;68(3):232-6.

96. Guarrera PM, Salerno G, Caneva G. Folk phytotherapeutical plants from Maratea area (Basilicata, Italy). *J Ethnopharmacol.* 2005;99(3):367-78.
97. Periodontology AAo. Glossary of periodontal terms. 4^a ed. Chicago: American Academy of Periodontology; 2001.
98. Cornelissen A, Maltha J, Von den Hoff J, Kuijpers-Jagtman A. Local injection of IFN-gamma reduces the number of myofibroblasts and the collagen content in palatal wounds. *J Dent Res.* 2000;79(10):1782.
99. Cornelissen A, Von den Hoff J, Maltha J, Kuijpers-Jagtman A. Effects of locally injected interferon- β on palatal mucoperiosteal wound healing. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(9):518-25.
100. Oda Y, Kagami H, Ueda M. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004;62(1):73-80.
101. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology* 2000. 1997;15(1):55-62.
102. Langlois CC, Devildos LR. Effect of the topical application of triamcinolone on the healing oral mucous membranes wounds. Histologic study in rats. *Rev Bras Pesqui Med Biol.* 1974;Jul/Aug;7(4):373-81.
103. Kutscher AH, Zegarelli EV, Beube FE, Chilton NW, Berman C, Mercadante JL et al. A new vehicle (Orabase) for the application of drugs to the oral mucous membranes* 1. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1959;12(9):1080-9.
104. Petelin M, Šentjurc M, Stolič Z, Skalerič U. EPR study of mucoadhesive ointments for delivery of liposomes into the oral mucosa. *Int J Pharm.* 1998;173(1):193-202.
105. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol in Vitro.* 2001;15(4-5):271-6.
106. Mariotti AJ, Rumpf DAH. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol.* 1999;70(12):1443-8.

107. Damour O, Zhi Hua S, Lasne F, Villain M, Rousselle P, Collombel C. Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. *Burns*. 1992;18(6):479-85.
108. Pucher J, Daniel J. The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *J Periodontol*. 1992;63(6):526.
109. Cline NV, Layman DL. The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *J Periodontol*. 1992;63(7):598.
110. Battino M, Bullon P, Wilson M, Newman H. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10(4):458-76.
111. Altman LC, Baker C, Fleckman P, Luchtel D, Oda D. Neutrophil-mediated damage to human gingival epithelial cells. *J Periodontal Res*. 1992;27(1):70-9.

ANEXO

Aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA, da
Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

**COEP**

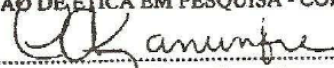
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

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