

GRAZIELA SPONCHIADO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO DA *Malva
sylvestris* COM POTENCIAL ATIVIDADE PARA TRATAMENTO DE
DISFUNÇÕES DA PELE

CURITIBA

2015

GRAZIELA SPONCHIADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - UFPR

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO DA *Malva sylvestris* COM POTENCIAL ATIVIDADE PARA TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES DA PELE

Tese apresentada ao Programa Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná – UFPR, apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
Co-Orientadores: Prof. Dr. Luis Monteiro Rodrigues
Profa. Dra. Cristina de Mello-Sampayo

CURITIBA
2015

Sponchiado, Graziela

Avaliação da eficácia e segurança da *Malva sylvestris* com potencial atividade para tratamento de disfunções da pele / Graziela Sponchiado – Curitiba, 2015.

116 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Michel F. Otuki

Coorientador: Professor Dr. Luis Monteiro Rodrigues

Coorientadora: Professora Dra. Cristina Mello-Sampayo

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. *Malva sylvestris*. 2. Pele. 3. Inflamação. 4. Despigmentação. 5. Efeitos adversos. 6. Eficácia. 7. Plantas medicinais. 8. Genotoxicidade. I. Otuki, Michel F. II. Rodrigues, Luis Monteiro. III. Mello-Sampaio, Cristina. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

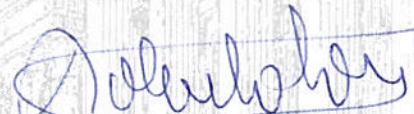
GRAZIELA SPONCHIADO

Título: “AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO DA *Malva sylvestris* COM POTENCIAL ATIVIDADE PARA TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES DA PELE”


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.




Prof. Dr. Michel Fleith Otuki
Orientador




Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Universidade Federal do Paraná



Profª. Drª. Mônica Lucia Adam
Universidade Federal de Pernambuco

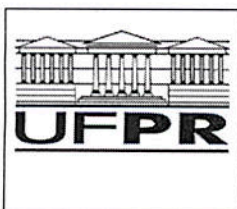


Profª. Drª. Cíntia Mara Ribas de Oliveira
Universidade Positivo



Profª. Drª. Eunice André
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 30 de julho de 2015.



1 Ata de julgamento da tese de doutorado da pós-graduanda aluna **GRAZIELA**
2 **SPONCHIADO**. No trigésimo dia do mês de julho de dois mil e quinze, às
3 quatorze horas, na Sala 05 do Setor de Ciências da Saúde da Universidade
4 Federal do Paraná, teve início a defesa de tese de doutorado intitulada
5 "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DO EXTRATO DA *Malva sylvestris*
6 COM POTENCIAL ATIVIDADE PARA TRATAMENTO DE DISFUNÇÕES DA
7 PELE", perante a Banca Examinadora composta pelos seguintes membros: Prof.
8 Dr. Michel Fleith Otuki – Orientador, Prof. Dr. Roberto Pontarolo - Universidade
9 Federal do Paraná, Prof^ª. Dr^ª. Mônica Lucia Adam - Universidade Federal de
10 Pernambuco, Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Mara Ribas de Oliveira - Universidade Positivo e
11 Prof^ª. Dr^ª. Eunice André - Universidade Federal do Paraná. A candidata
12 apresentou seu trabalho no tempo regulamentar e após arguição e feitos os
13 devidos esclarecimentos, a Banca Examinadora aprova a referida tese
14 como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor em Ciências
15 Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
16 área de Insumos, medicamentos e correlatos. Nada mais havendo a tratar,
17 encerrou-se a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que será assinada pelos
18 membros da Banca Examinadora e pela pós-graduanda.

19
20
21

22 Prof. Dr. Michel Fleith Otuki

23
24
25

26 Prof. Dr. Roberto Pontarolo

27
28
29

30 Prof^ª. Dr^ª. Mônica Lucia Adam

31
32
33

34 Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Mara Ribas de Oliveira

35
36
37

38 Prof^ª. Dr^ª. Eunice André

39
40
41
42

Graziela Sponchiado

AGRADECIMENTOS

Aos meus Orientadores Prof. Dr. Michel F. Otuki, Prof. Dr. Luis .Monteiro Rodrigues e Profa. Dra. Beatriz Lima-Silva, por todo o ensinamento, paciência, dedicação, aprendizado, trabalho e amizade nestes anos de convivência, permitindo o aperfeiçoamento da minha vida profissional.

A toda minha família e em especial ao meu marido Cassyano J. Correr que esteve sempre ao meu lado em todos os momentos, e aos meus filhos Laura Sponchiado Correr e Lorenzo Sponchiado Correr, por fazerem parte da minha vida, acreditarem que eu poderia concluir mais esta etapa, motivação para que esse período fosse mais leve. Meus filhos, obrigada pela paciência, sem mesmo terem discernimento para saber o que é isso, por terem tido a sensibilidade de abraçar ou fazer um carinho na mamãe quando me viam aflita e nervosa. Os seus sorrisos e a palavra “mamãe”, tem um poder calmante impressionante. Amo vocês.

Ao meu pai, Delvino Sponchiado e minha mãe Lindamir M. Sponchiado, se não fosse vocês que sempre acreditaram em mim e me direcionaram, não chegaria e não seria quem sou profissional e pessoal. Amo vocês.

A minha mana, Daniella Sponchiado, você por mais que fosse mais nova sempre me mostrou o que é um exemplo de força e vontade de ser e viver, sempre me apoiando e me defendendo em tudo, nestes últimos meses você me apresentou um sentimento que não sabia que seria tão bom de ser tia e madrinha deste menino lindo e meigo que o Luca é. Obrigada amo vocês.

A Profa. Dra. Daniela Cabrini, por me aceitar no seu dia a dia de laboratório e pela amizade que construímos neste período.

Aos meus amigos de laboratório Arthur, Bruna, Cíntia, Camila, Luise, Daniel, Bruno, Priscila, Caroline, Maria Lucia e as estagiárias Angélica e Gabriela, por toda a ajuda, ensinamento e incentivo essenciais no dia a dia, dentro e fora da UFPR, pelas risadas e por aguentarem o meu mal humor matinal.

Em especial a Bruna Soley pelo empenho, disponibilidade e dedicação em me ajudar nesta reta final, e pela amizade desenvolvida neste período, a qual vou levar comigo; e ao Arthur Prudente por ter pacientemente me acompanhado nos experimentos, por ter respondido todas as minhas dúvidas, mesmo que repetidamente, e pela amizade desenvolvida neste período.

A Prfa. Dra. Mônica Lucia Adam que me iniciou na pesquisa científica na graduação, a Profa. Dra. Cíntia Mara Ribas de Oliveira que continuou este conhecimento científico me orientando no mestrado, as quais tenho muito carinho, respeito, o que se reflete na nossa amizade, mesmo que distantes e nos trabalhos que realizamos em conjunto até hoje, tenho muitas saudades das nossas conversas, puxadas de orelha e risadas, vocês foram essências para que eu chegasse aonde estou.

Aos professores e colegas da Universidade de Lisboa e da Universidade Lusófona, em especial a Profa. Dra. Cristina Sampayo por toda a amizade e ajuda profissional em cada dia que morei e trabalhei em Lisboa, e que se prolonga até hoje.

Aos servidores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e Farmacologia sempre dispostos e prestativos a me ajudar.

A agência de fomento CAPES, que financiou minha bolsa durante o período de doutorado, assim como o período do doutorado sanduiche em Portugal.

A todos que contribuíram de alguma forma direta ou indiretamente para realização desse doutorado.

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem
perder o que, com frequência, poderíamos
ganhar, por simples medo de arriscar.

William Shakespeare

A alegria evita mil males e prolonga a vida.

William Shakespeare

Tenho em mim todos os sonhos do mundo.

Fernando Pessoa

A força não provém da capacidade física.
Provém de uma vontade indomável.

Mahatma Gandhi

Estou firmemente convencido que só se perde
a liberdade por culpa da própria fraqueza.

Mahatma Gandhi

RESUMO

Existem diversas intervenções medicamentosas disponíveis para o tratamento de distúrbios cutâneos (defeitos no processo de melanogênese, e o desenvolvimento de distúrbios inflamatórios), contudo a ocorrência de reações adversas é bem frequente. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia (na atividade anti-inflamatória e no processo de melanogênese) e a segurança (citotoxicidade e genotoxicidade) do extrato etanólico (EE) da *Malva sylvestris* L. Desta forma foi realizado ensaios *in vivo*, com camundongos Swiss, para avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato em modelo de edema de orelha agudo, edema de pata agudo, e edema de orelha crônico. Ensaios de genotoxicidade (Cometa e Micronúcleo (MN)) também foram realizados, tanto *in vitro* (fibroblastos, queratinócitos e melanócitos), como *in vivo*. Os ensaios de viabilidade celular (por meio do MTT e VN) foram realizados nas três linhagens celulares. Os ensaios de melanogênese espontânea foram conduzidos em melanócitos, e a atividade da enzima tirosinase também foi avaliada. A partir dos resultados obtidos foi observado que o extrato apresentou atividade anti-inflamatória quando administrado por via tópica e oral, onde foi capaz de reverter a formação do edema de orelha (camundongos Swiss) mediado por TPA em $\cong 83\%$ (1 mg/orelha) e $\cong 38\%$ (0,5 mg/kg), e a partir de duas formulações tópicas $\cong 82\%$ (Creme 1%) e $\cong 86\%$ (Gel 5%). Da mesma forma, o extrato foi capaz de reverter a formação do edema de pata induzido pela aplicação de LPS em $\cong 55\%$ (300 mg/kg). O extrato também foi eficaz quando utilizado no modelo de inflamação crônica induzido por imiquimode (IMQ), onde foi capaz de inibir a formação do edema de orelha em até $\cong 79\%$. O extrato novamente mostrou eficácia *in vitro*, onde reduziu os níveis de melanina em $\cong 36\%$ (3 $\mu\text{g/mL}$), assim como, a atividade da enzima tirosinase em $\cong 54\%$ (3 $\mu\text{g/m}$). A utilização do extrato mostrou-se segura, uma vez que, não foram identificados efeitos adversos *in vivo*, não alterando o peso dos órgãos avaliados (timo, adrenais, orelha e baço), após seu uso contínuo por 4 dias. A partir de análises *in vitro* o mesmo extrato mostrou-se da mesma forma seguro, uma vez que, não apresentou citotoxicidade, nas três linhagens celular avaliadas, nas concentrações utilizadas (0,03 a 10 mg/m). Ensaios genotóxicos reforçaram os resultados de segurança obtidos, uma vez que o extrato não apresentou atividade genotóxica tanto, *in vitro* (0,03 $\mu\text{g/mL}$ to 100 $\mu\text{g/mL}$) como *in vivo* (1 mg/orelha, medula óssea e sangue periférico). Estes resultados mostram que o EE da *M. sylvestris* é eficaz e seguro no tratamento de processos inflamatórios cutâneos, agudos e crônicos, e de distúrbios pigmentares, em diferentes modelos experimentais, por diferentes vias de administração e formas farmacêuticas. Por outro lado, os dados pré-clínicos fornecidos por este estudo unindo com os encontrados na literatura, fornecem base para estudos clínicos tópicos com a *M. sylvestris*.

Palavras-chaves: *Malva sylvestris*, Pele, Inflamação, Despigmentação, efeitos adversos, Eficácia, Plantas medicinais, Genotoxicidade.

ABSTRACT

There are several medication interventions available to treat skin disorders (defects in the melanogenesis process and the development of inflammatory disorders), but the occurrence of adverse reactions is very common. In this context, the present investigation aimed to verify the efficacy in the inflammatory activity and in the melanogenesis process, as well as security (cytotoxicity and genotoxicity) of the ethanolic extract (EE) of *M. sylvestris* L. Therefore, was carried out *in vivo* assays, to assess the anti-inflammatory response of the EE of *M. sylvestris* on acute Swiss mice ear oedema and paw oedema models, induced by phlogistics agentes, and on multiple application of imiquimod (IMQ) on mice ear oedema model. Genotoxicity assays (Comet and micronucleus (MN)) were also performed both *in vitro* (fibroblasts, keratinocytes and melanocytes), and *in vivo*. Cell viability assays (using the MTT and VN) were performed on the three cell lines. Spontaneously melanogenesis assays were conducted in melanocytes and tyrosinase enzyme activity was also evaluated. The *in vivo* assessment, demonstrate anti-inflammatory activity of EE *M. sylvestris*, reducing significantly ear oedema induced by TPA, when given topically (aproximadamente 83 %, (1 mg/ear) and when given orally (aproximadamente 38 % (0.5 mg/kg). The same way, in two pharmaceutical forms, reducing significantly ear oedema induced by TPA, when applied topically (cream 1%), about 82 %, and about 86 % (gel 5 %). In the same way the paw oedema induced by LPS reducing significantly, about 54 % (300 mg/kg). Similarly, reducing significantly ear oedema induced by multiple application of IMQ, when applied topically (cream 5 %), about 79 %. The *in vitro* studies showed that EE of *M. sylvestris* decreased melanin content at a maximum of about 36 % (3 µg/mL) and decreased tyrosinase activity at a maximum of about 54 % (3 µg/mL). Thus, EE of *M. sylvestris* proved to be safety, since, were not identified *in vivo* adverse effects, did not change the weight of evaluated organs (thymus, adrenals, ear and spleen), after their multiple application. The *in vitro* assays did not show cytotoxicity to the concentration used, 0,03mg/mL a 10 mg/mL, proved to be safe. The genotoxic activity did not identify on *in vitro* (0.03 µg/mL to 100 µg/mL), and *in vivo* (1 mg/ear) assays, proved to be safe in the same way. These results show that the EE of *M. sylvestris* is effective and safe on acute and chronic inflammatory cutaneous treatment, and on pigmentary disorders, in different experimental models by different routes of administration and dosage forms. In addition, preclinical data provided by combining this study with that found in the literature, offer the basis for clinical topical trials with *M. sylvestris*.

Palavras-chaves: *Malva sylvestris*, Skin, Inflammation, Depigmentation, adverse effects, Efficacy, Medicinal plants, Genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- A pele, suas camadas, estruturas e principais tipos celulares (com algumas funções) por camada.....	16
Figura 2 – Cascata inflamatória ocasionada por agentes biológicos em lesão de pele.	19
Figura 3 – Esquema simplificado do processo de melanogênese e consequente síntese de melanina ocasionado por duas vias de sinalização ou por redução da expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) ou por expressão do hormônio melanocítico estimulante do tipo alfa (α -MSH).....	29
Figura 4. Exemplar de <i>M. sylvestris</i> L	37
Figura 5. Delineamento experimental do modelo de genotoxicidade <i>in vivo</i> , com múltiplas aplicações do EE da <i>M. sylvestris</i>	56
Figura 6. Imagem representativa das classes de dano no DNA observadas pelo Ensaio Cometa.....	58
Figura 7. Delineamento experimental do modelo de edema de orelha induzido por múltiplas aplicações do IMQ.....	61
Figura 8. Avaliação da ação do EE da <i>M. sylvestris</i> , de aplicação por via tópica (T) e oral (v.o.), no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA ..	65
Figura 9. Avaliação da atividade anti-inflamatória do EE da <i>M. sylvestris</i> por via tópica em duas formas farmacêuticas (Creme e Gel) no edema de orelha induzido pelo TPA.	66
Figura 10. Avaliação da ação anti-inflamatória do EE da <i>M. sylvestris</i> administrado por via oral em modelo de edema de pata induzido por LPS.....	68
Figura 11. Efeito do EE da <i>M. sylvestris</i> em creme 5% (1 mg/orelha) no edema de orelha crônico induzido pela aplicação IMQ. A espessura das orelhas foi mensurada antes da indução com IMQ e, após ao tratamento diariamente	70
Figura 12. Ação do EE da <i>M. sylvestris</i> sobre a produção de melanina em cultura de mélanócitos (B16F10).	72
Figura 13. Efeito do EE da <i>M. sylvestris</i> sobre a atividade da enzima tirosinase <i>in vitro</i>	73
Figura 14. Efeito do EE da <i>M. sylvestris</i> sobre o peso de órgãos dos animais submetidos ao modelo de inflamação crônica induzido pela aplicação de IMQ.....	76
Figura 15. Imagens representativas dos órgãos dos animais submetidos ao modelo de inflamação crônica induzido pela aplicação de IMQ.....	77

Figura 16. Avaliação da viabilidade celular em cultura de melanócitos (B16F10 - A e B), fibroblasto (3T3 - C e D) e queratinócitos (HaCaT- E e F) após a exposição (24 horas) a diferentes concentrações do EE da <i>M. sylvestris</i>	79
Figura 17. Apresentação resumida dos resultados da revisão sistemática em forma de gráfico.	80
Figura 18. Frequência dos Ensaios/Técnicas de genotoxicidade mais utilizados pelos artigos incluídos na revisão	82
Figura 19. Escore médio do ensaio cometa em cultura de melanócitos (B16F10 – A e B), fibroblastos (3T3 - C) e queratinócito (HaCaT - D) após a exposição a diferentes concentrações do EE da <i>M. sylvestris</i>	84
Figura 20. Escore médio do ensaio cometa em cultura de melanócitos (B16F10), após a exposição a diferentes concentrações do EE da <i>M. sylvestris</i> . Proveniente de experimento em triplicata (n=3).	85
Figura 21. Escore médio do ensaio cometa em camundongos após a aplicação do EE da <i>M. sylvestris</i> (1 mg/orelha, 2 vezes/dia, 7 dias).....	85
Figura 22. Frequência de MN em células sanguíneas de camundongos Swiss após a aplicação do EE da <i>M. sylvestris</i> (1 mg/orelha, 2 vezes/dia, 7 dias).	87
Figura 23. Imagem representativa de eritrócitos de sangue periférico avaliados. PCE – Eritrócitos Policromático; NCE – Eritrócito Normocromático; NCEMN - Eritrócito Normocromático com MN.....	88
Figura 24 – Conclusões preliminares dos estudos do EE <i>M. sylvestris</i> que levam a uma eficácia e segurança do extrato estudado.	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enquadramento taxonômico <i>M. sylvestris</i> L.....	38
Tabela 2 – Desenho experimental para cada tratamento de cultura celular.....	54
Tabela 3 - Desenho experimental para cada tratamento da cultura de melanócitos, para avaliar o potencial de proteção e recuperação ao dano do DNA.....	55
Tabela 4 - Distribuição da incidência de Classe de dano ao DNA mais representativa, verificada no ensaio Cometa, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para cada grupo analisado	86

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	-	Ácido Araquidônico
AC	-	<i>Allium cepa</i>
AI	-	Indução da Apoptose
B	-	Branco
CA	-	Aberração Cromossômica
CN	-	Controle Negativo
DMEM	-	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DCA	-	Dermatite de Contato Alérgica
DCI	-	Dermatite de Contato Irritativa
DHICA	-	5,6-diidroxiindol-2-carboxílico
DOPA	-	3,4-diidroxifenilalanina
EDTA	-	Etilenodiaminotetracético
EE	-	Extrato Etanólico
EEMS	-	Extrato Etanólico de <i>Malva sylvestris</i>
E.P.M.	-	Erro padrão da médio
GR	-	Glicocorticóide
ICAM	-	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
i.p.	-	Intraperitoneal
i.pl.	-	Intraplantar
IL	-	Interleucina
IMQ	-	Imiquimode
LMP	-	Agarose De Baixo Ponto De Fusão
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LT	-	Leucotrienos
MI	-	Índice Mitótico
MN	-	Micronúcleo
MSH	-	Hormônio Melanocítico Estimulante
NA	-	Segregação somática em <i>Aspergillus nidulans</i>
OC	-	Óleo De Cróton
ON	-	Óxido Nítrico
PAMP	-	Padrão Molecular Associado à Patógeno
PBS	-	Tampão Fosfato
PECAM	-	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PGs	-	Prostaglandinas
PUVA	-	Psoraleno + UVA
PKC	-	Prateína Quinase C
RI	-	Índice de Replicação
RXL	-	<i>Ring-X-loss</i>
SC	-	Mutação em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCE	-	Troca de cromátides irmãs
SFB	-	Soro Fetal Bovino
SNC	-	Sistema Nervoso Central
T	-	Tópico
TGF	-	Fator de crescimento tumoral
TNF	-	Fator de Necrose Tumoral

TPA	-	12-O-tetradecanoilforbol acetato
TRP	-	Tirosinase
UC	-	Umu-C
UDS	-	<i>Unscheduled DNA Synthesis</i>
UEM	-	Unidade epidermo melânica
UV	-	Radiação Ultravioleta
UVA	-	Radiação Ultravioleta A
UVB	-	Radiação Ultravioleta
v.o.	-	via oral
V	-	Veículo
VIT	-	VITOTOX
VN	-	Vermelho Neutro

LISTA DE SIGLAS

Ames	-	<i>Salmonella/microsomal</i>
ANOVA	-	Análise De Variância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARRIVE	-	Guia de condução de pesquisas em animais
ERA	-	Reversão em <i>E. coli</i> WP2
FM	-	<i>Mutações subsequentes</i>
HGPRT	-	<i>Locus of Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl-Transferase</i>
ICPM	-	Peptídeos citoplasmáticos indutores de mutações
MTT	-	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
ICP-OES	-	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i>
PDB	-	Quebra do DNA plasmidial
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
SCGE	-	<i>Single Cell Gel Eletrophoresis</i> - Cometa ou Eletroforese de célula única
SHA	-	Anomalia da cauda do espermatozoide
SLRL	-	Mutação recessiva do <i>Lethal X-linked</i> em <i>Drosophilla melanogaster</i>
SMART	-	Mutação somática e recombinação
SOS	-	SOS <i>Inductest</i>
FDA	-	<i>Food and Drug Administration</i>
CDSCO	-	<i>Central Drugs Standard Control Organization</i>
EMA	-	<i>European Medicines Agency</i> ou EMEA
OECD	-	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
EURL	-	<i>European Union Reference Laboratory</i>
EMEA	-	<i>European Medicines Agency</i>

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO CUTÂNEO	18
1.1.1 Doença Inflamatória crônica.....	22
1.1.2 Dermatite de contato.....	24
1.1.3 Processo inflamatório infeccioso	26
1.2 DISTÚRBIOS DE PIGMENTAÇÃO DA PELE	28
1.2.1 AGENTES DESPIGMENTANTES.....	33
1.2.2 AGENTES PIGMENTANTES	35
1.3 PLANTAS MEDICINAIS	35
1.3.1 <i>Malva sylvestris</i> L.....	36
2 JUSTIFICATIVA.....	44
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1.1 Detalhamento das atividades a serem desenvolvidas.....	46
4.1.2 Animais	46
4.1.3 Linhagens celulares e manutenção das células.....	46
4.1.4 Obtenção do Extrato	47
4.1.5 Drogas e Reagentes	48
4.1.6 Ensaios de Viabilidade celular.....	49
4.1.7 Quantificação do conteúdo de melanina.....	50
4.1.8 Avaliação da atividade da enzima tirosinase.....	51
4.1.9 Ensaios de Genotoxicidade.....	51

4.1.10 Avaliação do edema	58
4.1.11 Dermatite de contato aguda induzida pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) na orelha	59
4.1.12 Avaliação do edema de pata induzido pela aplicação de LPS	60
4.1.13 Edema de orelha crônico induzido por Imiquimode (IMQ)	60
4.1.14 Análises estatísticas	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EE DA <i>M. sylvestris</i> IN VIVO	63
5.2 AVALIAÇÕES DA EFICÁCIA DO EXTRATO ETANÓLICO DA <i>M. sylvestris</i> in vitro	71
5.2.1 Avaliação da atividade melanogênica do EE da <i>M. sylvestris</i>	71
5.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO ETANÓLICO DA <i>M. sylvestris</i> . 75	
5.3.1 Avaliação do possível efeito adverso do EE da <i>M. sylvestris</i> sobre o peso dos órgãos	75
5.3.2 Avaliação da citotoxicidade in vitro	77
5.3.3 Avaliação do potencial genotóxico	80
6 CONCLUSÕES	91
7 REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A pele ou *cúti*s é o órgão de revestimento do organismo, representando aproximadamente 15% do peso corporal de um humano adulto, que reveste e delimita o organismo protegendo-o, por meio das inúmeras funções em relação ao meio exterior (AZULAY, R.D. e AZULAY, D.R. , 1999). A pele constitui-se em uma complexa estrutura de tecidos de várias naturezas, dispostos e inter-relacionados de modo a adequar-se, de maneira harmônica, ao desempenho de suas funções. A pele compõe de duas camadas: a epiderme e a derme. Abaixo delas está o tecido subcutâneo, denominado hipoderme ou *panículo adiposo* (ARNOLD *et al.*, 1994) (Fig. 1).

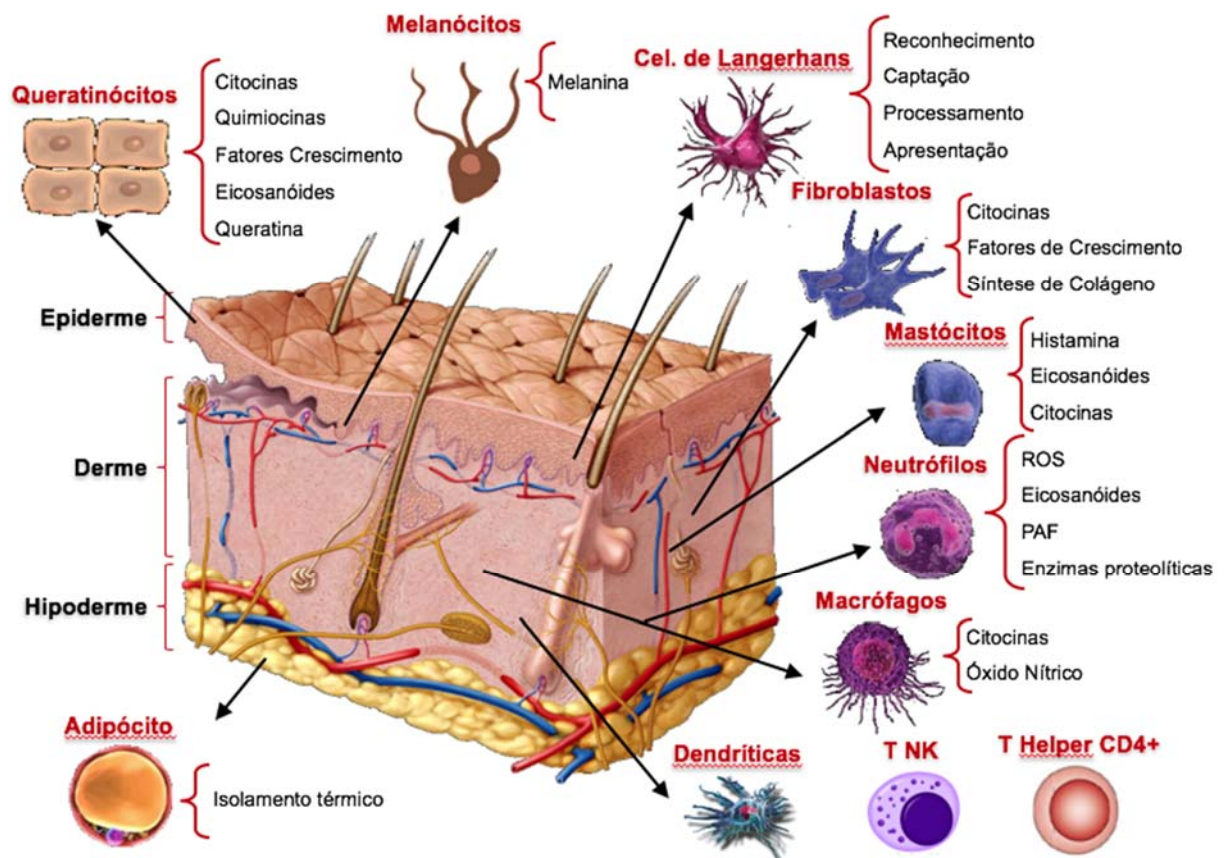


Figura 1- A pele, suas camadas, estruturas e principais tipos celulares (com algumas funções) por camada. Fonte: Adaptado de https://classconnection.s3.amazonaws.com/279/flashcards/1914279/jpg/skin_anatomy1349126253055.jpg, (Acessado em Dezembro, 2014).

Na epiderme, quatro camadas podem ser distinguidas morfológicamente, a camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea

(BLUMENBERG e TOMIC-CANIC, 1997). A função da camada basal é sustentar a epiderme firmemente prendendo-a na lâmina basal e promover a proliferação se necessário. A função da camada espinhosa é iniciar o processo de diferenciação produzindo um novo citoesqueleto, ligação célula-célula e outras funções. A função da camada granulosa é produzir o envelope de proteína, fazer a ligação das enzimas e lipídeos apropriados. Na camada córnea, as proteínas serão associadas a estrutura dos lipídeos e a formação da barreira pouco permeável (BLUMENBERG e TOMIC-CANIC, 1997).

A epiderme e seus anexos funcionam como uma barreira pouco permeável protegendo o organismo contra microorganismos, e para que não ocorra o processo de desidratação. Para desenvolver suas funções, enquanto é deparada com traumas físicos – químicos do ambiente, estes tecidos sofrem continuamente o rejuvenescimento pelo processo de homeostase, e, em adição, eles também sofrem o processo de reparo (cicatrização) em resposta a uma lesão no epitélio estratificado (FUCHS, 2008). Segundo AZULAY e AZULAY (1999), destacam-se, ainda, as seguintes funções específicas: proteção, percepção, hemorregulação e termorregulação, secreção, excreção, e metabolização.

Ainda considerando o aspecto estrutural, a epiderme compõe-se de três tipos básicos de células: os queratinócitos, os melanócitos e as células de Langherans, possuindo estas últimas papel na imunovigilância local e na sensibilização (AZULAY, R.D. e AZULAY, D.R. , 1999). Os queratinócitos, também chamados células escamosas, possuem a função específica de produzir queratina, um complexo filamentos proteico que, além de formar a camada exterior (extrato córneo) da epiderme, é também a proteína estrutural dos pelos e unhas (ARNOLD *et al.*, 1994).

Os melanócitos são as células de pigmentação da epiderme. Eles se originam da crista neural e podem ser encontrados dentro da epiderme fetal já na oitava semana de desenvolvimento. Estas células têm como papel primordial produção de melanina, cujo processo de biossíntese é chamado melanogênese (ARNOLD *et al.*, 1994).

A derme consiste em um tecido conjuntivo, cuja espessura é superior ao da epiderme, confere à pele elasticidade, força tênsil e resistência mecânica. Ela também interage com a epiderme através de uma rica rede vascular dermo-epidérmica e confere as trocas de elementos nutritivos e metabólicos (SPELLBERG, 2000; HAAKE

et al., 2001). Esta camada é composta principalmente por fibroblastos os quais são responsáveis pela síntese de colágeno e elastina (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; FREINKEL e WOODLEY, 2001; HAAKE *et al.*, 2001; KANITAKIS, 2002; NESTLE; KAPLAN; *et al.*, 2009), glicosaminoglicanos, proteoglicanos, fibronectina e outras proteínas da matriz celular que dão suporte e elasticidade ao órgão, além da produção de citocinas e secreção de fatores de crescimento necessários para a sobrevivência de leucócitos e queratinócitos (SPELLBERG, 2000). Nesta camada também se encontram células especializadas do sistema imune como as células dendríticas (CDs), células *T helper* (Th) CD4+ e células *T natural killer* (NKT) (NESTLE; DI MEGLIO; *et al.*, 2009; PERERA *et al.*, 2012), as quais fazem parte do sistema imune inato e respondem a estímulos antigênicos de maneira rápida e não específica. Apesar da maioria não ser célula apresentadora de antígenos, elas são capazes de processar e apresentar antígenos às células T (PERERA *et al.*, 2012).

A hipoderme é o tecido subcutâneo, confere suporte para derme, é constituída de tecido adiposo, ricamente servido por nervos e vasos sanguíneos, e faz conexão entre a derme e a fáscia muscular, sendo a espessura da camada de tecido adiposo variável à pessoa e à localização. Funcionalmente, ajuda na regulação térmica, proteção no amortecimento de estresse mecânico, depósito nutricional, reserva de energia, modelação da superfície corporal, e fixação dos órgãos (KANITAKIS, 2002; MAKRANTONAKI *et al.*, 2007).

Com base nas diversas funções desempenhadas pelo tecido cutâneo, assim como sua importância na manutenção da homeostase e proteção do organismo, a pele é um dos órgãos mais utilizado, e acessível, para o teste de novos tratamentos para doenças inflamatórias e de pigmentação da pele. Uma vez que, possibilita a avaliação de medicamentos tópicos para patologias cutâneas, adesivos para tratar problemas sistêmicos, e até mesmo a terapia gênica (IYER *et al.*, 1999; OHYAMA *et al.*, 2006).

1.1 PROCESSO INFLAMATÓRIO CUTÂNEO

O processo inflamatório pode ser definido como uma cascata de eventos que ocorrem em resposta a um estímulo nocivo, trauma ou infecção com objetivo de eliminar os microrganismos (fagocitados, por exemplo) ou substâncias irritantes e

reparar o tecido (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; LIEW, 2003; CALIXTO *et al.*, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004) (Fig. 2). Além da indispensável atuação na reconstituição do tecido, os queratinócitos são capazes de desencadear uma resposta de defesa perante estes estímulos nocivos, principalmente por serem células com grande quantidade de interleucina-1 α (IL-1 α) em seu interior. A IL-1 α liberada para o meio circundante é capaz de iniciar uma cascata inflamatória (SABAT *et al.*, 2007). A IL-1 α portanto, é um sinal de perigo imediato liberada pelos queratinócitos quando estes sofrem algum tipo de lesão (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

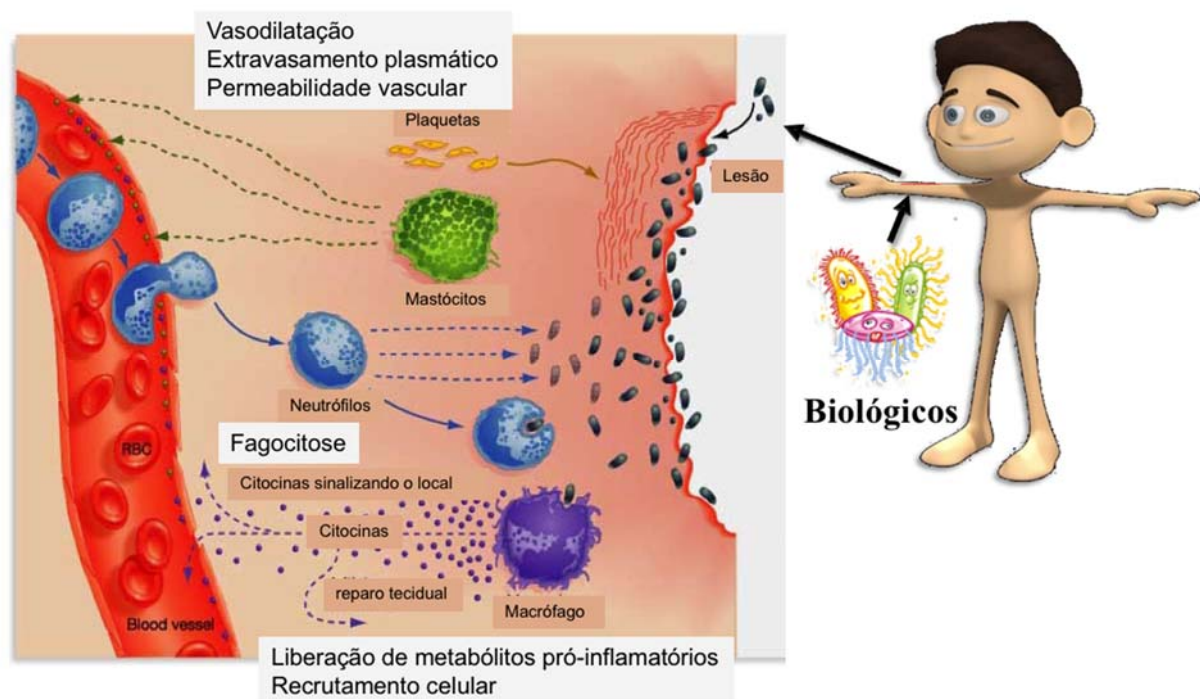


Figura 2 – Cascata inflamatória ocasionada por agentes biológicos em lesão de pele.
Fonte: Adaptado de <http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lecturesf04am/lect23.htm>, (Acessado em Setembro, 2015).

Conseqüentemente, os queratinócitos circundantes respondem a IL-1 α , produzindo mais IL-1 α , bem como IL-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-6, amplificando o sinal inicial, sendo que, lesões por raios ultravioletas e infecção microbiana podem estimular diretamente a liberação destas citocinas (BAILEY, 1988; SPELLBERG, 2000; LAWRENCE e GILROY, 2007).

A presença do infiltrado de polimorfonucleares também promove uma facilitação do recrutamento de monócitos para o tecido lesionado, uma vez que, a presença de neutrófilos apoptóticos representa um sinal capaz de atrair monócitos.

Além disso, os polimorfonucleares são capazes de sintetizar e liberar fatores de crescimento, como, por exemplo, o fator de crescimento de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), o qual será de grande importância na ativação e na manutenção dos leucócitos durante a resposta inflamatória (BAILEY, 1988; SPELLBERG, 2000; LAWRENCE e GILROY, 2007).

Com o aumento da concentração de citocinas no tecido lesionado, estas moléculas podem participar da ativação de outros constituintes celulares da pele, como por exemplo, chegarem à derme e participarem da ativação de fibroblastos e células endoteliais. Quando estimulados, os fibroblastos também passam a sintetizar e liberar citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF- α), sendo este um evento importante para a manutenção do processo inflamatório cutâneo. Além disso, a presença destas citocinas na derme é capaz de ativar células endoteliais locais, e induzir a expressão de moléculas que irão contribuir para a defesa do órgão (SPELLBERG, 2000; JACOBI *et al.*, 2006; LOWES *et al.*, 2007; MAN, M. Q. *et al.*, 2008).

Além da expressão de moléculas de adesão, o endotélio se contrai e abre os poros nos capilares papilares e vênulas da camada reticular e isto, somado aos efeitos promovidos pela vasodilatação, ou seja, redução da pressão intraluminal associada a uma menor força de cisalhamento, facilitam o extravasamento dos leucócitos para o interstício extracelular. O endotélio também está envolvido na liberação de alguns metabólitos pró-inflamatórios como, por exemplo, o ácido araquidônico (AA), leucotrienos (LT) e prostaglandinas (PGs), resultando em vasodilatação local, aumento do fluxo sanguíneo, seguido de extravasamento de líquido e edema (CALIXTO, 2000; SPELLBERG, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; LEE, H. S. *et al.*, 2009; BEHROOZ BARIKBIN *et al.*, 2010).

Enquanto isto, na epiderme, as células de Langherans são responsáveis por realizar a apresentação de antígenos aos linfócitos T, e ativá-los levando ao desencadeamento de uma resposta imune. Após a estimulação local das células T, gera-se um ambiente muito mais complexo de citocinas na epiderme, que passam pela derme e culminam na ativação e recrutamento de leucócitos do compartimento vascular, com o objetivo de se restabelecer a homeostasia do órgão (ARATANI *et al.*, 1999; SPELLBERG, 2000).

A resposta inflamatória na pele também tem participação do sistema nervoso central (SNC), pois suas fibras nervosas que terminam na epiderme modulam o tônus vascular nas reações inflamatórias através de secreção de uma variedade de fatores, incluindo óxido nítrico (ON) e substância P. Além disso, o SNC recebe informações através de sinais aferentes e modula a resposta imune através de sinais eferentes, podendo gerar uma resposta estimulante ou inibitória dependendo da duração da sinalização aferente (SPELLBERG, 2000).

Assim, a estimulação das fibras nervosas pelas citocinas locais faz com que ocorra a liberação da substância P, e essa provocará nas células endoteliais uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de induzir a degranulação dos mastócitos somado ao efeito de outros neuropeptídeos. A histamina e outros mediadores liberados pelos mastócitos, por sua vez, facilitam o efluxo de leucócitos para o interstício dérmico, pois amplificam a vasodilatação local e derrame vascular. Assim, todos esses eventos, em conjunto, resultam nos quatro sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, tumor e dor (SPELLBERG, 2000; LAWRENCE e GILROY, 2007).

A regulação desse processo inflamatório é crucial, pois qualquer anormalidade na resposta imune ou inflamatória está diretamente implicada na patogênese de muitas doenças cutâneas (LEE, D. Y. *et al.*, 2009) e conseqüentemente na restauração de sua estrutura e função da pele afetada. Assim, para que o processo inflamatório seja uma resposta benéfica ao organismo, deve haver uma fina regulação entre os eventos responsáveis por iniciar o processo inflamatório, assim como, os responsáveis pela sua resolução (LAWRENCE e GILROY, 2007).

Desta maneira, a resolução do processo inflamatório, a fim de manter a homeostasia, pode ocorrer através de diferentes mecanismos. Inicialmente, o aumento do número de células fagocitárias no local da injúria participa ativamente da redução do número de agentes agressores locais, reduzindo conseqüentemente a apresentação de antígenos e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, passam a ser sintetizadas e liberadas citocinas com características anti-inflamatórias, como, por exemplo, a IL-10 e o fator de crescimento transformante-beta (TGF- β). A IL-10, por exemplo, é capaz de inibir a atividade de macrófagos ativados, o que lhe torna uma interleucina importante para o controle das reações imunes durante a

resposta inflamatória. De maneira semelhante, o TGF- β participa da resolução de processos inflamatórios, pois é capaz de reduzir a proliferação de linfócitos e a atividade de leucócitos, além de estarem envolvidos com a supressão da secreção de citocinas inflamatórias (SPELLBERG, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

As doenças inflamatórias cutâneas podem ser desenvolvidas por estímulos endógenos ou exógenos, como alteração gênica e exposição a agentes irritantes, respectivamente. Existem vários tipos de doenças da pele que são marcadas, geralmente, por interrupção da barreira com consequente perda de função, proteção, seguida de inflamação, sensibilização e alterações no padrão de proliferação e diferenciação dos queratinócitos (PROKSCH *et al.*, 2008).

De maneira geral, a resposta inflamatória inata, em condições normais, tem início poucos minutos depois do estímulo nocivo, e se resolve em poucas horas. No entanto, quando por algum fator esta resposta inflamatória não se resolve, persistindo por semanas, meses ou até mesmo anos, pode levar ao desencadeamento de doenças inflamatórias crônicas (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; LAWRENCE e GILROY, 2007). (DEBENEDICTIS *et al.*, 2001).

1.1.1 Doença Inflamatória crônica

Entre as doenças inflamatórias crônicas, que têm como patogênese uma resposta inflamatória alterada ou intensificada, encontram-se a doença de *Crohn*, esclerose múltipla, psoríase, lúpus eritematoso sistêmico e vasculite sistêmica (GILROY *et al.*, 2004).

Psoríase, por exemplo, é uma das doenças inflamatórias crônicas, com uma prevalência mundial que afeta entorno de 3 % da população, a qual é mediada pelo sistema imune, e se manifesta principalmente por lesões cutâneas, sendo que a variação de incidência da doença parece ser fortemente influenciada por fatores climáticos e étnicos, embora o entendimento dessas relações seja ainda bastante complexo (JACOBSON *et al.*, 2011). Sua etiologia não é bem esclarecida, embora a transmissão genética esteja claramente envolvida, contudo parece não ser suficiente para a manifestação dos sintomas, mas atua como um predisponente, sendo necessária a interação com estímulos ambientais para a expressão dos genes em questão, e consequentemente o desenvolvimento da doença (ORTONNE, 1996). Além disso, vários fatores parecem ser capazes de desencadear ou agravar os

sintomas da doença como o consumo de álcool, tabagismo, lesões por trauma e estresse (BASAVARAJ *et al.*, 2011).

Fisicamente a doença se caracteriza pela presença de lesões psoriáticas classicamente como placas bem demarcadas, eritematosas e descamativas na pele, que podem ser isoladas ou confluentes (ALBANESI *et al.*, 2007; GUDJONSSON e ELDER, 2007; HUEBER e MCINNES, 2007). As placas psoriáticas típicas surgem de alterações patológicas em praticamente todas as células da pele, sendo a principal característica histopatológica, a hiperproliferação dos queratinócitos seguido de uma hiperqueratose. Assim, microscopicamente a psoríase se caracteriza por uma epiderme hiperproliferativa, com maturação prematura dos queratinócitos e cornificação incompleta, com retenção de células nucleadas no estrato córneo. Na camada basal, a taxa mitótica encontra-se aumentada, em comparação com uma pele normal, resultando num espessamento da epiderme, que pode formar sulcos alongados que se projetam na derme, denominados acantose. Além disso, existe um intenso infiltrado de leucócitos, acompanhado por um acentuado aumento no fluxo sanguíneo local (GUDJONSSON e ELDER, 2007; HUEBER e MCINNES, 2007; PIETRZAK *et al.*, 2008; PERERA *et al.*, 2012).

As alterações histopatológicas observadas na psoríase são resultantes da atividade anormal do sistema imune observada na pele psoriática, na qual o processo inflamatório instalado é resultado de uma estimulação persistente das células T por antígenos epidérmicos, com a participação tanto da imunidade inata quanto da adquirida. Portanto, na psoríase, as alterações imuno-inflamatórias parecem estar associadas a uma super expressão de várias citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-22, IL-23), além do IFN- γ e TNF- α , bem como a hiperproliferação dos queratinócitos mediada por essas citocinas fazem parte da composição celular do infiltrado inflamatório nas placas psoriáticas (PIETRZAK *et al.*, 2008). Todos esses fatores que implicam no desenvolvimento da psoríase comunicam-se através de uma cascata de eventos que levam à ativação das células dendríticas, que por sua vez, migram até os linfonodos com o objetivo de realizarem a apresentação de antígenos às células T. Posteriormente, há a migração das células T para a pele, onde estas se dividem e multiplicam, e são responsáveis pela produção e liberação de quimiocinas, além da interação com o endotélio, levando à expressão de moléculas de adesão, as quais

facilitam a diapedese de leucócitos para o sítio lesado. Todos estes eventos contribuem para a manutenção do processo inflamatório, porém, como existe um desequilíbrio, esta resposta persistente leva ao desenvolvimento das lesões psoriáticas (PERERA *et al.*, 2012).

Assim como a patogênese, o tratamento da psoríase também é complexo, e normalmente é selecionado de acordo com o tipo e a gravidade do quadro (severa, moderada e leve) (SEELIGER *et al.*, 2003; MAN, M.-Q. *et al.*, 2008). Quando o quadro da doença é considerado severo o tratamento geralmente é por via sistêmica (Metotrexato, retinoides, Ciclosporina e agentes biológico (anti-TNF- α , indutor da morte e da migração das células T) (ARRUDA *et al.*, 2004; AFIFI *et al.*, 2005; HUEBER e MCINNES, 2007; MAN, M.-Q. *et al.*, 2008; BOLLER *et al.*, 2010), quando o quadro é considerado moderado a leve utiliza-se da fototerapia (UVA e PUVA) e da terapia tópica (corticóides, análogos da vitamina D e retinoides) (AFIFI *et al.*, 2005; LI e ARMSTRONG, 2012). Apesar de existirem diversas medidas terapêuticas disponíveis, o tratamento ideal ainda não foi descrito, sendo que os principais problemas encontrados são a baixa efetividade ou o aparecimento de efeitos adversos que acabam por prejudicar a adesão do paciente ao tratamento. No entanto, o uso prolongado de determinados fármacos pode causar efeitos adversos cutâneos como atrofia da pele, aparecimento de estrias, erupções acneiformes, dermatite de contato, taquifilaxia e telangiectasias. Ainda, o uso crônico pode levar ao desenvolvimento de tolerância, onde a eficácia é reduzida (SEELIGER *et al.*, 2003; MAN, M.-Q. *et al.*, 2008; BOLLER *et al.*, 2010; LI e ARMSTRONG, 2012).

1.1.2 Dermatite de Contato

A Dermatite de Contato é uma reação inflamatória da pele que se caracteriza pela ocorrência de eritema e prurido, podendo ocorrer de maneira isolada ou simultaneamente, em diferentes porções do corpo (WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013). Essas dermatites ocorrem por exposição direta da pele a alguns estímulos externos, podendo ser classificadas como dermatites de contato alérgicas (DCA) ou dermatites de contato irritativas (DCI) (AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY *et al.*, 2006; WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013; FONACIER *et al.*, 2015), e diferenciam-se em alérgicas ou irritativas dependendo dos fatores responsáveis por desencadear o processo inflamatório, ou seja, a causa da reação, e, conseqüentemente, pelos

mecanismos fisiopatológicos envolvidos (WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013). Dentre alguns dos principais desencadeadores das dermatites de contato estão os metais, como o níquel, presente em constituintes de bijuterias, armações de óculos, acessórios metálicas de roupas, grampos de cabelo e correntes (LIDEN, 2013; WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013; HJULER e OTKJAER, 2014).

1.1.2.1 Dermatite de contato alérgica (DCA)

O processo inflamatório responsável por desencadear a DCA é mediado diretamente por mecanismos do sistema imunológico, podendo ser causado por agentes de diferentes naturezas, como, por exemplo, substâncias inorgânicas, orgânicas, ou sintéticas (BAUER, 2013; WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013; HJULER e OTKJAER, 2014; FONACIER *et al.*, 2015).

A DCA caracteriza-se como uma reação de hipersensibilidade do tipo IV, em que uma substância estranha entra em contato com a pele e é reconhecida como um antígeno, que conduz a sensibilização. Após a re-exposição da epiderme ao antígeno, as células T sensibilizadas iniciam uma cascata inflamatória, levando as alterações cutâneas associadas com dermatite de contato alérgica (BAUER, 2013; BUTLER e MOWAD, 2013; DARLENSKI *et al.*, 2013; QUARANTA *et al.*, 2014; FONACIER *et al.*, 2015). Este tipo de dermatite também pode ser considerada um tipo de doença inflamatória crônica.

1.1.2.2 Dermatite de contato irritativa (DCI)

O processo inflamatório estabelecido na DCI inicia-se pela ocorrência de um dano tecidual, principalmente, após o contato direto da pele com um agente irritante, capaz de danificar a estrutura cutânea ao primeiro contato (BAUER, 2013; WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013; HJULER e OTKJAER, 2014; FONACIER *et al.*, 2015), ou inflamação cutânea do contato direto com um agente irritante. Os sintomas podem ocorrer imediatamente, e podem persistir até que o agente irritante seja reconhecido (BAUER, 2013; BUTLER e MOWAD, 2013; DARLENSKI *et al.*, 2013; QUARANTA *et al.*, 2014; FONACIER *et al.*, 2015). Compostos como: acrilatos e resinas de formaldeído utilizados nas indústrias em tintas, colas, adesivos e cosméticos são os principais responsáveis por desencadarem as dermatites de

contato irritativas (LIDEN, 2013; WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013; HJULER e OTKJAER, 2014).

Na DCI, a lesão causada na epiderme leva os queratinócitos a sintetizarem e liberarem uma série de mediadores pró-inflamatórios (como: IL-1, IL-6 e TNF- α), assim como de fatores quimiotáticos (como: leucotrienos e IL-8), e estimulação da expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (como: ICAMs e E-selectina), as quais facilitam a migração de células inflamatórias para o local da lesão. Além disso, a liberação local destes mediadores leva à dilatação dos vasos da derme (causando eritema) e extravasamento de plasma na derme, levando a formação de edema (WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013; QUARANTA *et al.*, 2014).

Durante o processo inflamatório, as células de Langerhans ativadas migram para os linfonodos mais próximos e ativam as células de defesa. Assim, há um intenso infiltrado de linfócitos T CD4+ na pele, os quais são responsáveis pela liberação de citocinas inflamatórias (como: IFN- γ e IL-2), levando à manutenção do processo inflamatório, com o objetivo de eliminar o agente agressor (BAUER, 2013; DARLENSKI *et al.*, 2013).

Como tratamento para DCI são utilizados corticosteróide tópicos, com o intuito de reduzir a resposta imune, e anti-histamínicos mesmo que não sejam eficazes para reduzir o prurido associado à dermatite de contato (LIDEN, 2013; WOLLENBERG e FEICHTNER, 2013).

1.1.3 Processo inflamatório infeccioso

Os Lipopolissacarídeos (LPS) são os principais constituintes da membrana celular externa de bactérias gram-negativas, apresentando elevada toxicidade, estas endotoxinas são reconhecidas como o principal fator, relacionado com bactérias gram-negativas, responsável por manifestações tóxicas de infecções severas e inflamação generalizada e podendo induzir até septicemia (RIETSCHER e BRADE, 1992; BONE, 1993; TUIN *et al.*, 2006).

O LPS é capaz de desencadear vias de sinalização intracelular através de seu reconhecimento e ligação com receptores de membrana denominado *Toll-Like* do tipo 4 (TLR4), que, quando hiperativados, são capazes de desencadear uma resposta inflamatória, principalmente, através da ativação do fator de transcrição nuclear *kappa*- β (NF- κ B), e o envolvimento de diversos mediadores inflamatórios (IL-

1, IL-6, IL-8, ON, TNF- α) (RAETZ e WHITFIELD, 2002). Desde sua descoberta, no final da década de 1990, os receptores TLR4 têm sido identificados como os receptores primariamente envolvidos em infecções microbianas, desencadeando uma resposta inflamatória que visa a eliminação do agente infeccioso, e permitido avanços significativos na compreensão dos mecanismos envolvidos na imunidade inata e adquirida (CHEN e GREENE, 2004).

A ativação dos receptores TLR4 pela ligação com o LPS pode levar ao desencadeamento de diferentes vias de sinalização intracelular, como, por exemplo, a via das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), das STATs (*signal transducer and activator of transcription*), entre outras. Contudo, uma das principais vias ativadas pelo LPS é a via do fator de transcrição NF- κ B, este quando se transloca para o núcleo é capaz de induzir a transcrição de diversos genes pró-inflamatórios (LAFLAMME e RIVEST, 2001; CHEN e GREENE, 2004).

O NF- κ B é um fator de transcrição central da resposta inflamatória, a sua ativação por estímulos inflamatórios, como o LPS, culmina na repressão ou transcrição de vários genes, levando as células a um estado ativado pronto para responder à injúria, e também para transcrever proteínas com características pró – inflamatórias (LAFLAMME e RIVEST, 2001; WALTER *et al.*, 2007).

De uma maneira geral, o organismo é capaz de detectar mesmo pequenas quantidades de LPS circulante, com o objetivo de combater um possível foco infeccioso. Sendo essa função de reconhecimento principalmente desempenhada por monócitos circulantes, que frente a um estímulo positivo podem ativar diferentes vias de sinalização. Por exemplo, os leucócitos podem passar a expressar diferentes moléculas, como: ICAM e PECAM (moléculas de adesão), TNF, IL-6, IL-1, enzimas como iNOS, COX-2, além de receptores, como os de bradicinina do subtipo B1. A produção dessas diferentes proteínas promove uma sinalização variada, objetivando a indução de uma resposta de controle frente ao LPS. Entretanto, em casos em que há excesso de endotoxina circulante, ou uma reação exacerbada, pode haver o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica (RAETZ e WHITFIELD, 2002; DUVERNOY e RISOLD, 2007).

1.2 DISTÚRBIOS DE PIGMENTAÇÃO DA PELE

A cor da pele é o resultado da presença e interação de uma série de substâncias presentes da epiderme e derme, denominadas cromóforos, sendo a melanina o complexo mais importante (YOON *et al.*, 2003). Entre eles, a oxihemoglobina (vermelho brilhante), a hemoglobina reduzida (vermelho *bluish*) e a bilirrubina (amarelo) são encontrados nos pequenos vasos presentes na derme. Já na epiderme, a eumelanina (marrom escuro), a feomelanina (amarelo ou vermelho escuro) e, em menor quantidade, os carotenóides (amarelo) são os pigmentos mais encontrados (PETIT e PIERARD, 2003).

A melanina corresponde a um grupo complexo de biopolímeros pigmentados produzidos em células altamente especializadas chamadas melanócitos, encontrados na lâmina basal da epiderme, nos folículos pilosos e, em menor quantidade, na derme (AHN *et al.*, 2003). Melanócitos são células dendríticas que na epiderme, em conjunto com queratinócitos, formam uma unidade funcional denominada "unidade epidermo-melânica" (UEM) e interagem na produção e distribuição de melanina humana durante o processo de pigmentação (AHN *et al.*, 2003). Uma típica UEM é composta por 1 melanócito em contato com ~35-40 queratinócitos vizinhos, além de células de Langherans e fibroblastos que também podem estar presentes (YOON *et al.*, 2003). A quantidade de melanócitos varia em função da área considerada, existindo cerca de 2000/mm² na pele da cabeça e antebraços e cerca de 1000/mm² no restante do tegumento. A quantidade de melanócitos não varia em função da raça, levando à conclusão de que diferenças raciais de pigmentação não se devam ao número, mas à capacidade funcional dos melanócitos. Além da pele, os melanócitos são encontrados no aparelho ocular, na retina, no ouvido, no sistema nervoso central, nas leptomeninges, nas mucosas e nos pelos (SAMPAIO, S.A.P. e RIVITTI, E.A. , 1998).

O primeiro, e limitante, passo na formação da melanina é mediado pela tirosinase (AHN *et al.*, 2003). A tirosinase catalisa a hidroxilação da tirosina em 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA) e sua subsequente oxidação em dopaquinona. Por um processo de auto-oxidação e ciclização espontânea, a dopaquinona produz a melanina 5,6-diidroxindol (DHI), convertida em eumelanina. Por outra via enzimática, o intermediário dopacromo, na presença da dopacromo tautomerase (também chamada TRP-2), é convertido a ácido 5,6-diidroxindol-2-carboxílico (DHICA),

posteriormente oxidado a melanina DHICA pela TRP-1, também conhecida como DHICA oxidase, e eumelanina. Em uma outra via, ainda, a dopaquinona, na presença de glutatíon ou cisteína, pode formar a cisteinildopa, convertida em feomelanina num processo de oxidação, ciclização e polimerização (PETIT e PIERARD, 2003; DESSINIOTI *et al.*, 2009) (Fig. 3). O MC1R é o receptor hormônio melanocítico estimulante do tipo alfa (α -MSH) clássico dos melanócitos. É expresso por melanócitos cutâneos, o que também é uma chave para determinação da pigmentação da pele. É notável que o MC1R é expresso por leucócitos, onde faz a mediação de propriedade inflamatórias e imunomoduladoras da melanocortina (HEARING, 1999; GANTZ e FONG, 2003).

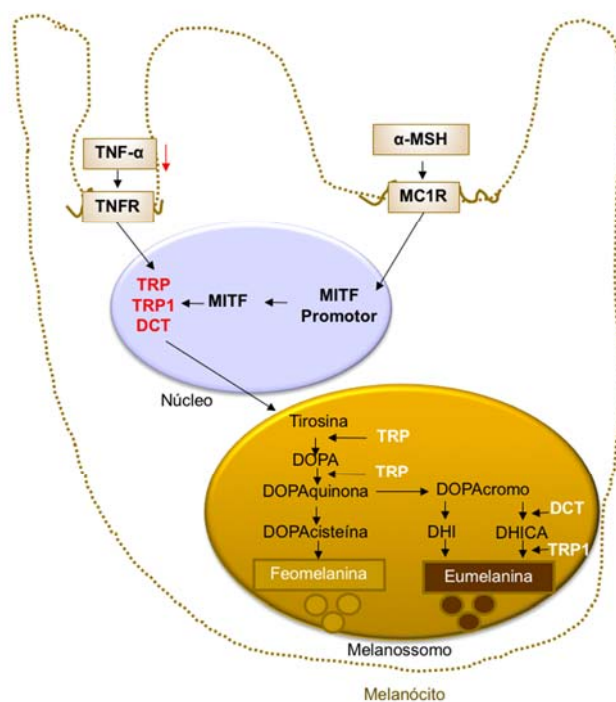


Figura 3 – Esquema simplificado do processo de melanogênese e consequente síntese de melanina ocasionado por duas vias de sinalização ou por redução da expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) ou por expressão do hormônio melanocítico estimulante do tipo alfa (α -MSH). Fonte: Adaptado de (KIM, 2015).

De acordo com o tipo de melanina sintetizada, eumelanossomos elipsóides ou feomelanossomos esféricos serão formados. Essas organelas maduras, então, migram às extremidades dos dendritos dos melanócitos de onde são transferidos a queratinócitos circunvizinhos (PETIT e PIERARD, 2003). A presença de receptores de protease ativada (PAR-2), expressos nos queratinócitos, mas não nos melanócitos,

podem estar envolvidos nessa transferência (SEIBERG *et al.*, 2000). A pigmentação resultante é finalmente diminuída pela degradação da melanina durante a ascensão dos queratinócitos até a região do extrato córneo. A melanina remanescente desse processo é perdida por processo de descamação (PETIT e PIERARD, 2003).

Durante o processo melanogênico, os queratinócitos são responsáveis pela produção de fatores parácrinos que afetam a proliferação de melanócitos, a síntese de melanina e a transferência da melanina a queratinócitos adjacentes (AHN *et al.*, 2003). Diversas substâncias endógenas são responsáveis pelo controle biológico do processo de melanogênese, entre elas várias citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α), fatores de crescimento (ET-1, β TGF) e mediadores inflamatórios (leucotrienos, prostaglandinas) (PETIT e PIERARD, 2003). Encontra-se bem estabelecido, porém, que o estímulo mais importante da melanogênese imediata (oxidação da melanina pré-formada) é a luz visível. A radiação ultravioleta (UVA e UVB) constitui o fator estimulante tardio (por neoformação de melanina como consequência inflamatória) mais importante da pigmentação da pele humana (AHN *et al.*, 2003; ORDIZ, 2003). Cabe ainda salientar que a produção de melanina também está subordinada à porção intermediária da hipófise por meio de seu hormônio: a intermedina ou MSH. Existe ainda uma substância denominada melatonina que produz o clareamento da pele ao induzir a agregação dos grânulos de melanina ao redor do núcleo das células. A melatonina é produzida pela hipófise pela ação da noradrenalina (SAMPAIO, S.A.P. e RIVITTI, E.A. , 1998; AZULAY, R.D. e AZULAY, D.R. , 1999).

A melanina desempenha importante papel na defesa da pele humana (SHOJI *et al.*, 1997; SAMPAIO, S.A.P. e RIVITTI, E.A. , 1998), seja pela captura de radicais livres oxidativos ou contra os efeitos nocivos da luz ultravioleta (UV), por sua propriedade de absorver e refletir essa radiação (ELLER *et al.*, 1994; SAMPAIO, S.A.P. e RIVITTI, E.A. , 1998). Há uma significativa inversão entre a pigmentação cutânea e a ocorrência de tumores malignos e lesões por UV (VIRADOR *et al.*, 1999). Neste sentido, a pigmentação da pele, resultante da produção e distribuição de melanina na epiderme, é a principal defesa fisiológica contra a irradiação solar (COMMO *et al.*, 2004).

A uniformidade e a cor da pele têm também um importante papel estético, que pode ser comprometido por doenças envolvendo a pigmentação (VIRADOR *et al.*, 1999). Doenças ligadas à pigmentação são bastante frequentes e dependentes

tanto de fatores genéticos como ambientais (PETIT e PIERARD, 2003; FISTAROL e ITIN, 2010). Essas doenças, em que a densidade ou distribuição dos melanócitos encontra-se alterada ou há falhas em algum dos passos da cascata melanogênica, são denominadas discromias (PETIT e PIERARD, 2003; DESSINIOTI *et al.*, 2009).

Discromias são alterações patológicas caracterizadas por alterações da coloração natural da pele, que deixam marcas ou máculas mais escuras (hipercromias) ou mais claras (hipocromias). Resultam da diminuição (leucodermias) ou aumento da melanina (melanodermias). Outros pigmentos endógenos (bilirrubina, alcaptona, derivados hemoglobínicos) e exógenos (cloroquina, tetraciclina, clofazimina, ouro e outros) também podem produzir discromias (SAMPAIO, S.A.P. e RIVITTI, E.A., 1998; AZULAY, R.D. e AZULAY, D.R., 1999).

As hipocromias caracterizadas por manchas com um tom mais claro do que a pele normal do indivíduo, podem ser ocasionadas por redução da melanina epidérmica, que de uma maneira geral resultam da ausência de melanócitos, ou problemas na formação e transferências dos melanossomas para os queratinócitos, o que leva a uma produção insuficiente de melanina (PENG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015). Esta classe de discromia é representada por doenças como albinismo, piebaldismo, poliose, nevo acrômico, hipomelanose de Ito, Síndrome de Chediak-Higashi, Síndrome de Klein-Waardenburg, Síndrome de Cross-McKusick-Breen, e a mais comum, Vitiligo (AZULAY, R.D. e AZULAY, D.R., 1999; NICOLAIDOU e KATSAMBAS, 2014).

O vitiligo é o exemplo mais comum de hipocromias, de cunho crônico, sendo caracterizado pelo desenvolvimento de máculas despigmentadas, que podem crescer lentamente, com surgimento também de novas lesões, uma vez que essas lesões quando completamente desenvolvidas não possuem melanócitos e, nem infiltrado inflamatório (TARLE *et al.*, 2014). Conforme a sua manifestação clínica o Vitiligo pode ser dividido em: vitiligo não-segmentar (mais comum, manchas bem demarcadas), segmentar (manchas pouco demarcadas) e indeterminado (mácula branca isolada sem distribuição segmentar) (EZZEDINE *et al.*, 2012). A patogênese ainda não tem uma hipótese definida, podendo ser ocasionada por defeito na adesão epiderme do melanócito, hipótese bioquímica, hipótese neural, hipótese relacionada com estresse oxidativos. Mas a mais aceita é a hipótese autoimune (SANDOVAL-CRUZ *et al.*,

2011), principalmente por ser acompanhada pela alteração das imunidades humoral e celular, e altos níveis de auto-anticorpos circulantes (IgG, anti-TRP1 e anti-TRP-2), entre outros (KEMP *et al.*, 1997; LE POOLE e LUITEN, 2008; SCHALLREUTER *et al.*, 2008). Existem diferentes opções para o tratamento do vitiligo, levando em consideração vantagens e desvantagens ao paciente, sendo que, na sua maioria o tratamento consiste em restaurar o pigmento da pele, principalmente por migração e ativação dos melanócitos (JO *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

O tratamento envolvendo o uso de corticosteróides pode levar a uma inibição de possíveis auto-anticorpos anti-melanócitos ativos, sendo aplicados principalmente de maneira tópica. Psoralênicos administrados por via tópica ou sistêmica, estimulam a repigmentação quando ativados através da UV, sendo o uso tópico indicado somente em casos de máculas localizadas, sendo de extrema importância que não ocorra exposição à luz solar (JO *et al.*, 2014; IMEN *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015), já que tem maior propensão a queimaduras solares em decorrência a falta de melanócitos e, conseqüentemente, de melanina local que confere a proteção ao UV. Agentes despigmentantes só são recomendados quando as discromias já possui uma extensão de despigmentação que atinge grande parte do corpo (GUPTA *et al.*, 2012).

Entre essas discromias, as causadas por excesso de melanina são as mais frequentes e particularmente problemáticas em indivíduos de pele negra (PETIT e PIERARD, 2003). Entre as hiperpigmentações adquiridas mais comuns estão a melnose actínica, o melasma, hiperpigmentações medicamentosas, melanodermias tóxicas, nevus melanocíticos comuns e as fitofotodermatoses (AZULAY, R.D. e AZULAY, D.R., 1999).

Um estudo de 2006, reportado por Handel *et al* (2014), o qual foi conduzido pela Sociedade Brasileira de Dermatologia, demonstrou que em 57.346 diagnósticos, 8,4% foram para melanodermias e dentre estas encontrava-se o melasma. O melasma é caracterizado por uma hiperpigmentação crônica, em geral pontual e de ocorrência simétrica, sobretudo com maior incidência na região da face das pessoas, e sem sintomas (TAYLOR e ANDERSON, 1994; RAJARATNAM *et al.*, 2010; HANDEL *et al.*, 2014). Esta disfunção tem uma prevalência para o sexo feminino, e quando estas manchas aparecem durante a gestação são chamadas são também conhecidas como cloasma. Este tipo de mancha raramente se recupera espontaneamente (RAJARATNAM *et al.*, 2010; HANDEL *et al.*, 2014; JANG *et al.*, 2015). A

hiperpigmentação que ocorre deste distúrbio é consequência de aumento da melanina no local, porém seu mecanismo de ação ainda não está elucidado (RAJARATNAM *et al.*, 2010; JANG *et al.*, 2015). Quanto ao aumento de melanina local, o melasma pode ser dividido em três tipos: epidermal, dermal e misto. Melasma epidermal é o mais superficial com aumento da melanina na superfície da epiderme. Já no melasma dermal, ocorre um aumento da melanina na derme, e no melasma misto este aumento de melanina ocorre tanto na superfície da epiderme quanto na derme (RAJARATNAM *et al.*, 2010). Existem alguns fatores de riscos já definidos que justificam a ocorrência do melasma como: predisposição genética (alterações da expressão de genes como o H19 (relacionado a insulina) e relacionados a expressão da TYRP1 (Tirosinase tipo 1)), exposição a radiação UV, fatores hormonais como os que ocorre no sexo feminino, disfunções na tireoide, gravidez, algumas drogas como a fenitoína (HANDEL *et al.*, 2014; SARKAR *et al.*, 2014) e inflamações de pele (PLENCK, 1776). No Brasil, foi relatado que pacientes com melasma ou um fenótipo mais avançado deste distúrbio apresentaram maior incidência de hiperpigmentação pós-inflamatória (HEXSEL *et al.*, 2014).

1.2.1 AGENTES DESPIGMENTANTES

Agentes despigmentantes ou hipopigmentantes são substâncias capazes de alterar a pigmentação da pele. Os agentes despigmentantes comumente usados atuam sobre os melanócitos, nas diversas etapas da melanogênese e/ou na transferência da melanina para os queratinócitos. São eficazes em vários distúrbios funcionais dos melanócitos, entre eles o melasma, porém menos em problemas ligados à hiperplasia melanocítica, como as lentiginoses (HERMANNNS, 2002). Estes agentes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação, considerando que alguns fármacos podem agir simultaneamente em várias etapas do processo melanogênico (PETIT e PIERARD, 2003).

Vários agentes despigmentantes estão disponíveis para comercialização, contendo um ou mais fármacos em associação. Estas formulações podem ser de medicamentos de prescrição, não-prescritos (venda livre) ou cosméticos. Os quesitos para registro desses produtos podem variar consideravelmente de um país para o outro, resultando em diferenças de eficácia e segurança de acordo com a região do mundo. O uso de associações desses agentes é muito comum, provendo melhora no

perfil de eficácia e tolerabilidade por meio de mecanismos de ação complementares ou sinérgicos entre os fármacos (PETIT e PIERARD, 2003).

Desde a introdução da hidroquinona como um agente despigmentante em 1961, diversos produtos para o tratamento da hiperpigmentação da pele foram introduzidos no mercado farmacêutico e cosmético (BRIGANTI *et al.*, 2003) como: tretinoína (ácido retinóico), corticosteróides, ácido azelaico, ácido fítico, ácido ascórbico, ácido glicólico, α - e β -hidroxiácidos e o ácido kójico. A hidroquinona foi a referência para o tratamento da hiperpigmentação nos últimos 40 anos (HALDER e RICHARDS, 2004; SARKAR *et al.*, 2014). Ela age no processo de melanogênese, inibindo desse modo a produção da melanina. Alguns dos outros mecanismos de ação possíveis são: a destruição dos melanócitos, a degradação dos melanossomas e a inibição da síntese do DNA e do RNA em melanócitos (BRIGANTI *et al.*, 2003).

Embora a hidroquinona seja amplamente utilizada, as reações adversas ao seu uso são comuns e incluem dermatite de contato ou irritante assim como hipopigmentação da pele (CAYCE *et al.*, 2004; SARKAR *et al.*, 2014; ZHONG *et al.*, 2015). Devido a estas reações adversas o uso combinado da hidroquinona com agentes não fenólicos é cada vez mais comum (RENDON, 2004). Embora benéfico para muitos pacientes, a maioria destes cosméticos ou medicamentos não elimina permanentemente a pigmentação anormal ou ainda é associada com os efeitos colaterais significativos (RAJARATNAM *et al.*, 2010; GONG *et al.*, 2015).

Para alguns casos de hiperpigmentação como o melasma existem tratamentos com diferentes tipos de lasers, que atingem diferentes comprimentos de onda (CHO *et al.*, 2009). Para alguns a fototermólise é seletiva para melanossomas e não melanócitos. Os melanócitos que podem ter sobrevivido, conferem uma baixa funcionalidade não produzindo melanossomas completamente maduros. Contudo a utilização repetitiva do laser pode inativar não apenas os melanócitos locais, mas os adjacentes, podendo causar hipopigmentação (JANG *et al.*, 2015). Assim como também já foi verificado que o tratamento com laser pode causar hiperpigmentação, como efeito colateral (LEE, H. S. *et al.*, 2009), faz com que o tratamento continue sendo um desafio.

1.2.2 AGENTES PIGMENTANTES

Os agentes pigmentantes ou hiperpigmentantes também são substâncias capazes de alterar a pigmentação da pele. São poucos os agentes atualmente disponíveis com ação pigmentante, entre os agentes mais usados para o tratamento para o vitiligo, pode se incluir a fotoquimioterapia com agentes psoralênicos (5-metoxipsoraleno, 8-metoxipsoraleno, PUVA), fototerapia com radiação UVB, corticóides sistêmicos e pseudocatalase. Ao passo que, as opções terapêuticas mais modernas incluem o uso de imunomoduladores tópicos ou inibidores de calcineurina (tacrolimus, pimecrolimus), análogos da vitamina D3 e L- fenilalanina (SAMPAIO e RIVITTI, 2000; FORSCHNER *et al.*, 2007; COLUCCI *et al.*, 2012). Os agentes despigmentantes devem ser usados somente em caso de vitiligo extensivo (COLUCCI *et al.*, 2012).

Pacientes com vitiligo requerem períodos prolongados de uso, normalmente por períodos mais longos daqueles recomendados para dermatoses de cunho inflamatório. Isso resulta no surgimento de efeitos colaterais (atrofia cutânea, hipertricose, hipopigmentação perilesional, etc), limitando a terapia (GARG *et al.*, 2010), assim não atingindo a eficácia desejada na promoção da repigmentação das áreas lesionadas da pele.

Segundo Leão (2005), as plantas medicinais são ricas em moléculas que possuem atividades biológicas (LEÃO *et al.*, 2005). Porém, segundo Lapa (2000), o uso popular das plantas medicinais não é suficiente para validá-las como medicamentos eficazes e seguros, pois estas não se diferenciam de qualquer outro xenobiótico sintético. Assim, a preconização ou autorização oficial do seu uso como medicamento devem estar fundamentadas em evidências experimentais a partir de estudos de eficácia e segurança *in vivo* e *in vitro* (LAPA *et al.*, 2000).

1.3 PLANTAS MEDICINAIS

Durante séculos, o tratamento com plantas medicinais foi o único recurso disponível para diferentes grupos étnicos, e hoje em dia, as plantas ainda são utilizadas na medicina tradicional para tratar, aliviar ou prevenir diversas doenças, dentre elas algumas alterações patológicas cutâneas (EL GHAOUI *et al.*, 2008).

É grande o interesse das indústrias no uso de substâncias naturais como fontes de novos medicamentos, principalmente pela necessidade de inovação no tratamento de algumas doenças, entre outros fatores como a competitividade da indústria farmacêutica (CALIXTO, 2000).

De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) ainda uma boa parte da população mundial não têm acesso ao atendimento primário de saúde e recorre especialmente às plantas medicinais (AKERELE, 1993; CALIXTO, 2000; STROHL, 2000). Isso muito provavelmente porque o uso de plantas medicinais para tratamento de doenças é o mais antigo método existente de que a humanidade tem conhecimento (WHO, 2007).

Embora as plantas medicinais sejam utilizadas frequentemente para tratamento e estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos (MANTLE *et al.*, 2001; WHO, 2007), este recurso é ainda pouco explorado. A atividade biológica foi avaliada somente para uma pequena parcela de espécies de plantas identificadas no mundo (RATES, 2001; VERPOORTE e MEMELINK, 2002) e a segurança torna-se uma grande preocupação para as autoridades de saúde pública (WHO, 2007).

1.1.2 1.3.1 *Malva sylvestris* L.

É uma planta ereta, pubescente, com sua raiz principal perpendicular, grossa, fusiforme, branca, carnuda, e de raízes secundárias finas; caule ereto ou ascendente, ramoso, de 60 a 90 cm de altura. Folhas verdes, moles, macias ao tato, pubescentes, com cinco a sete lóbulos pouco profundos. As flores são pediceladas com numerosos pelos; corola de cinco pétalas livres, maiores que o cálice, chanfradas, coradas de rosa-violáceo, raiadas de vermelho e estames numerosos (COSTA, 2002) (Fig. 4). As folhas e flores são inodoras e possuem sabor mucilaginoso (COSTA, 2002; GASPARETTO *et al.*, 2012). No exame microscópico verifica-se a existência de numerosas células de mucilagem em toda a planta, abundantes no parênquima foliar e mais nas sépalas e pétalas (COSTA, 2002).



Figura 4. Exemplar de *M. sylvestris* L. (SCIENTIFIC-WEB, 2011).

Entre as numerosas espécies utilizadas na medicina popular, *M. Sylvestris* (Malvaceae) destaca-se por uma variedade de usos, sendo o seu consumo relatado desde 3000 aC. Na região da Síria, estudos arqueológicos mostraram a existência de sementes de *M. sylvestris* no cálculo dentário de fósseis humanos. Os pesquisadores concluíram que o consumo desta espécie é de longa data, tanto por ser uma planta comestível ou por suas possíveis propriedades medicinais (HENRY e PIPERNO, 2008).

Nos últimos tempos, o consumo de *M. sylvestris* tem sido muito amplo, mas a importância desta espécie surgiu porque pesquisas revelaram importantes propriedades terapêuticas (TOMODA *et al.*, 1989; DANIELA *et al.*, 2007; CONFORTI; SOSA; MARRELLI; MENICHINI; STATTI; UZUNOV; TUBARO; LOGGIA, 2008; QUAVE; PLANO; *et al.*, 2008; CHICLANA *et al.*, 2009; SLEIMAN e DAHER, 2009; BARROS *et al.*, 2010; GASPARETTO *et al.*, 2012).

1.3.1.1 Enquadramento Taxonômico e Origem Geográfica

Nome científico *M. sylvestris* L. e pertence à família botânica Malvaceae. Também pode ser conhecida com os nomes populares como: malva-selvagem, malva-maior, malva-branca, malva-grande, malva-das-boticas, malva-de-casa, malva-verde, malva-oficial, malva-vulgar e malva-silvestre (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000). O enquadramento taxonômico completo segundo Engler e Cronquist segue na Tabela 1 (MELCHIOR, 1964 ; CRONQUIST, 1981).

Esta espécie é nativa da Europa, Ásia e Norte da África (QUAVE; PIERONI; *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2010) e do continente americano, frequentemente encontrada nos campos, caminhos e entulhos (COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004).

Tabela 1 – Enquadramento taxonômico *M. sylvestris* L.

CLASSIFICAÇÃO	ENGLER	CRONQUIST
DIVISÃO	Angiospermae	Magnoliophyta
CLASSE	Dicotyledoneae	Magnoliopsida
SUBCLASSE	Archychlamydeae	Magnoliidae
ORDEM	Malvales	Malvales
FAMÍLIA	Malvaceae	Malvaceae
GÊNERO	Malva Linnaeus	<i>Malva</i> Linnaeus
ESPÉCIE	<i>Malva sylvestris</i> Linnaeus	<i>Malva sylvestris</i> Linnaeus

1.3.1.2 Definição Farmacognóstica

A *M. sylvestris* tem demonstrado importância mundial na medicina tradicional. Em alguns casos, a *M. sylvestris* é consumida *in natura* com função levemente laxativa, para aliviar desconforto do fígado e do estômago (GUARRERA, 2003; ISHTIAQ *et al.*, 2007). Em outros casos é utilizada em preparação farmacêutica, para distúrbios gastrointestinais, dores abdominais, dor de estômago, e doenças respiratórias (LEPORATTI e CORRADI, 2001; CORNARA *et al.*, 2009; IDOLO *et al.*, 2010). Também pode ser utilizada como alimento, no preparo de sopas e salada (ISHTIAQ *et al.*, 2007).

As partes aéreas (folhas e flores) são mundialmente conhecidas devido às propriedades farmacológicas (anti-inflamatórias, principalmente contra gengivites, abscessos e as dores de dentes) (SCHERRER *et al.*, 2005; CONFORTI; SOSA; MARRELLI; MENICHINI; STATTI; UZUNOV; TUBARO; LOGGIA, 2008; POLLIO *et al.*, 2008; IDOLO *et al.*, 2010; GASPARETTO *et al.*, 2012). Adicionalmente, as folhas e as flores têm amplo uso no tratamento de problemas urológicos, picada de inseto, queimaduras, furúnculos e feridas ulceradas (GUARRERA, 2003; LARDOS, 2006; CORNARA *et al.*, 2009), obesidade e pressão alta e até para doenças virais como caxumba (FERREIRA *et al.*, 2006; KÜLTÜR, 2007). A forma de aplicação/utilização relatada é muito variável (para cada parte da planta também) como: decocção, infusão, tintura, banhos, pomadas, emplastos (MARTINAZZO e MARTINS; MIRALDI

et al., 2001; SOUZA *et al.*, 2004; SCHERRER *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2006; KÜLTÜR, 2007; BULUT e TUZLACI, 2008; CHICLANA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2012; MIKAILI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; KOVALIK *et al.*, 2014), vapor, loções, xaropes (BARROS *et al.*, 2010).

No Brasil, a ANVISA recomenda que da Malva sejam utilizadas tanto as flores como as folhas, como infusão, em aplicação oral (2 g em 150 mL) e tópica (6 g em 150 mL), com posologia de 1 xícara de chá 4 vezes ao dia, e aplicação de 3 a 4 vezes ao dia, respectivamente, para tratamento de afecções respiratórias (expectorante) e contusões e processos inflamatórios da boca e garganta, com indicação para adultos e crianças, sem contra indicações e efeitos adversos relatados (BRASIL, 2010b).

1.3.1.3 Constituintes Químicos

A planta inteira tem demonstrado propriedades terapêuticas (BALLERO *et al.*, 2001; CHAU e WU, 2006; LEONTI *et al.*, 2009), mas em geral os efeitos farmacológicos da *M. sylvestris* são atribuídos para as folhas e flores (GUARRERA, 2003; SCHERRER *et al.*, 2005; IDOLO *et al.*, 2010), principalmente porque nessas estruturas verifica-se a presença de alguns flavonóides e mucilagens (POURRAT *et al.*, 1990; BILLETER *et al.*, 1991; CLASSEN e BLASCHEK, 2002). As mucilagens são um dos principais compostos, sendo responsáveis pelo efeito terapêutico da *M. sylvestris*, atuando na ação antitussígena (FRANOVA *et al.*, 2006).

Os polissacarídeos, em concentrações de 5% a 10%, são semelhantes aos encontrados para as demais plantas da família Malvaceae. Para as flores é relatada a presença de flavonóides, antocianidinas e leucoantocianidinas (POURRAT *et al.*, 1990; FARINA *et al.*, 1995; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004), em especial malvidina 3,5-diglucoside (malvina), malvidina 3-O-glicosídeo (oenina); delphinidina 3-O-glicosídeo; malvidina 3-O-(6"-O-malonilglucosídeo)-5-O-glicosídeo; delphinidina; cloreto de malvidina (POURRAT *et al.*, 1990); genisteína; miricetina; e derivados de apigenina, quercetina e campferol (TAKEDA *et al.*, 1989; FARINA *et al.*, 1995) e petunidina (POURRAT *et al.*, 1990; FARINA *et al.*, 1995). A cor das flores resulta de um antocianósido, o malvósido (FARINA *et al.*, 1995; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004)

Nas folhas também foi verificada a presença de flavonoides e mucilagens (8,2%), assim como também foi verificado nas flores mucilagens (6,1%), com

composição semelhante em relação a quantidades de ácido *D*-galacturônico, *D*-galactose, glucose, *L*-arabinose, xilose e *L*-ramnose. Na planta identificaram-se ainda malvona A (fitoalexina), taninos e vitaminas A, B1, B2, B9 e C. A cor das flores resulta de um antocianósido, o malvósido (FARINA *et al.*, 1995; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004). Em estudos mais recentes foi detectado também no extrato das folhas escopoletina (PRUDENTE *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014), quercetina, malvidina 3-glucoside (PRUDENTE *et al.*, 2013) ácido cafeico e ácido ferúlico (MARTINS *et al.*, 2014).

Existem ainda nas folhas terpenóides como sesquiterpenos, diterpenos, monoterpenos (CUTILLO *et al.*, 2006), aminoácidos, derivados de proteínas, derivados de fenol, enzimas, coumarinas, esteróides, compostos radioecológicos e pigmentos (clorofila A, B e xantofila) na composição química da *M. sylvestris*.

As folhas de *M. sylvestris* foram avaliadas quanto a sua composição química, para a determinação de não-metals, halogênios e essenciais, e elementos metálicos não essenciais. A análise realizada por *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (ICP-OES) revelou a presença de Al, Ba, Bi, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, La, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sn, Sr, Ti, U, Zn, Zr, B and Si (HICSONMEZ *et al.*, 2009). A análise quantitativa realizada por *Polarized X-ray Fluorescence Spectrometer* demonstrou a presença de K, Mg, Ca, Fe, Al, Mn, Sr, Zn, Cu, Rb, Cr, Ni, Co, Pb, Sn, Cd, Hg, S, Cl; P, Br, I, As (DESIDERI *et al.*, 2010). A *M. Sylvestris* mostrou também ter alta capacidade de acumular metais pesados (Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) provenientes do solo. Tornando importante a conscientização sobre os riscos do consumo da *M. sylvestris* pela populações (KHAN *et al.*, 2010).

1.3.1.4 Ação Farmacológica

In vitro

Alguns estudos revelaram que a *M. sylvestris* possui importantes propriedades terapêuticas tais como, antiulcerogênica, antioxidante, anticarcinogênica, atividadeantiinflamatória – normalmente sendo indicada para o tratamento das doenças bucais (DANIELA *et al.*, 2007; CONFORTI; SOSA; MARRELLI; MENICHINI; STATTI; UZUNOV; TUBARO; LOGGIA, 2008; QUAVE; PIERONI; *et al.*, 2008; CHICLANA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2010; BENSO, 2012).

Avaliações farmacológicas realizadas especificamente com infusões de *M. sylvestris* são raras, baseando-se, principalmente na correlação dos constituintes presentes. Porém, as preparações das folhas e flores dessecadas de *M. sylvestris*, na forma de infusos, são empregadas pelas propriedades emolientes, que se devem às mucilagens, na redução e/ou alívio do estímulo do catarro nas vias respiratórias superiores, em estados inflamatórios das mucosas e faríngea. O extrato hidroalcoólico das flores e folhas de *M. sylvestris* têm sido amplamente utilizado no alívio de tosses e doenças inflamatórias da mucosa e abscessos dentários. As folhas possuem ainda propriedades ocitócicas e ligeiramente hiperglicemiantes. As raízes, menos mucilaginosas, são utilizadas com pouca frequência (FARINA *et al.*, 1995; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2004).

M. sylvestris tem demonstrado efeitos antimicrobiano seja isoladamente (por diferentes metodologias) contra fungos (*Saccharomyces cerevisiae* (DE SOUZA *et al.*, 2004), *Aspergillus candidus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp e *Fusarium culmorum* (MAGRO *et al.*, 2006), *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida stelatoidea* e *Candida krusei* (ALVES *et al.*, 2009)) e bactérias (*Erwinia carotovora* (patógeno de planta), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* (RAZAVI *et al.*, 2011), *Bordetella bronchiseptica* (BONJAR, 2004), *Helicobacter pylori* (COGO *et al.*, 2010) *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* (ALVES *et al.*, 2009)), ou com efeito sinérgico como por exemplo contra *Staphylococcus aureus*, quando associada com anti-sépticos bucais à base de cloreto de cetilpiridínio (WATANABE *et al.*, 2008).

Estudos com extrato aquoso e metanólico das folhas e partes aéreas de *M. sylvestris*, têm demonstrado grande capacidade antioxidante (FERREIRA *et al.*, 2006; DELLAGRECA *et al.*, 2009; BARROS *et al.*, 2010; MAROUANE *et al.*, 2011), provavelmente devido à presença de fenóis, flavonóides, carotenóides e tocoferóis (BARROS *et al.*, 2010). Em um estudo comparativo envolvendo exemplares de diferentes regiões da Europa e da Ásia, a maior atividade antioxidante foi verificada com extratos metanólicos obtidos de plantas coletadas no nordeste de Portugal. Portanto, a intensidade da capacidade antioxidante pode estar relacionada à região onde a planta foi coletada (BARROS *et al.*, 2010).

A eficácia da atividade antiproliferativa/ citotóxica contra algumas linhagens de células tumorais, como B16 (melanoma de murino) e A375 (melanoma humano) foram verificadas utilizando extrato metanólico das folhas (DANIELA *et al.*, 2007). E também na linhagem HaCaT (queratinócito humano) foram verificadas utilizando o extrato etanólico das folhas (PRUDENTE, 2013).

Um estudo verificou que o extrato etanólico *M. sylvestris* (0,3 a 3 µg/mL) não possui atividade genotóxica, em cultura celular de fibroblasto de camundongo (3T3). Assim como não é citotóxico nas concentrações de 0,01 a 10 µg/mL na mesma linhagem celular (BENSO, 2012).

A atividade citotóxica também foi verificada na linhagem celular humana pré monocítica (U937-d) quando exposta ao EE *M. sylvestris* nas concentrações a partir de 100 µg/mL, assim como a atividade anti-inflamatória do extrato na mesma linhagem celular, induzidas pelo agente flogístico desferrioxamine mesylate (DFX, 400 µM), reduzindo os níveis de mediadores pró inflamatórios, PGE₂ e PGD₂ respectivamente, nas concentração do extrato de 10 µg/mL e 50 µg/mL (MARTINS *et al.*, 2014).

In vivo

Estudos *in vivo* demonstraram atividade anti-inflamatória, utilizando formulações tópicas e extratos, onde pôde-se verificar uma redução significativa de edema em camundongos (utilizando como agente indutor o TPA, OC, carragenina, ácido araquidônico e oxazolona) (CONFORTI; SOSA; MARRELLI; MENICHINI; STATTI; UZUNOV; TUBARO; MENICHINI; *et al.*, 2008; PRUDENTE, 2010; BENSO, 2012; PRUDENTE, 2013; PRUDENTE *et al.*, 2013) e ratos (utilizando como agente indutor carragenina, modelo agudo (CHICLANA *et al.*, 2009; SLEIMAN e DAHER, 2009) e utilizando como agente indutor a formalina, modelo crônico (SLEIMAN e DAHER, 2009).

O efeito antiulcerogênico também foi comprovado em modelos animais (ratos Wistar) com úlcera gástrica induzida por etanol e tratado com a utilização do extrato aquoso (500 mg/kg, via oral) (SLEIMAN e DAHER, 2009).

O efeito antinocepcivo foi verificado em modelos animais (camundongo Swiss), induzidos por formalina (2,5%, intraplantar) e tratados com extrato aquoso (10 mg/kg) (ESTEVEZ *et al.*, 2009).

O efeito hepatoprotetivo foi verificado recentemente por Hussain *et al.* (2014), onde utilizou modelo animal (camundongo), induzido por paracetamol (250 mg/kg,

intraplantar) e tratado por 7 dias com o extrato metanólico de malva (300 e 600 mg/Kg, intraplantar) (HUSSAIN *et al.*, 2014).

O poder cicatrizante também foi verificado em modelo de cicatrização de ferida na pele de ratos diabéticos (PIRBALOUTI *et al.*, 2010; GHASEMI PIRBALOUTI *et al.*, 2012). Alguns estudos demonstraram eficácia no tratamento dermatológico, principalmente por ajudar a manter a integridade da membrana, faz com que surja um interesse por parte das indústrias de cosméticos, em especial nas composições de uso tópico (hidratantes para prevenção da senescência) gerando patententes. Estes produtos têm mostrado alta eficiência para aliviar a irritação da pele, aumentar a produção de muco, eliminando a produção de radicais livres (SEIBERG e AL., 2006; KIM e AL., 2007).

Até o momento foram relatados apenas três estudos com base clínica para o extrato da *M. sylvestris*. Um estudo em 2010 utilizou o extrato da *M. sylvestris* em uma formulação com outros extratos de plantas, e verificou que a formulação apresentou efeitos de clareamento em distúrbios de pigmentação da pele em mulheres de origem oriental (TADOKORO *et al.*, 2010). Outro estudo, neste mesmo ano, verificou que uma formulação (pomada) a 4% do extrato *M. sylvestris* foi capaz de reduzir significativamente o eczema de mão nos pacientes, sem efeitos colaterais aparentes, por avaliação visual de acordo com o *Eczema Severity index (EASI) score* (BEHROOZ BARIKBIN *et al.*, 2010). Recentemente, um estudo relatou eficácia do extrato aquoso das flores da *M. sylvestris* (1 g/dia por 4 semanas) na redução de sintomas de pacientes com distúrbio gastrointestinal crônica (constipação funcional) (ELSAGH *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

A pele está sujeita constantemente a diversos traumas físicos, químicos ou biológicos, os quais podem levar ao desenvolvimento de alterações na estrutura cutânea. Dentre estas alterações podem ser citados defeitos no processo de melanogênese, os quais podem causar desordens de pigmentação da pele, e o desenvolvimento de desordens inflamatórias cutâneas, as quais, se não controladas ou tratadas de maneira eficiente, podem levar ao desenvolvimento de um processo inflamatório crônico.

Atualmente, existem diversas intervenções medicamentosas disponíveis para o tratamento de desordens cutâneas, contudo, também é comum verificar importantes efeitos adversos associados ao uso destes tratamentos. Assim, torna-se importante a descoberta de novas alternativas para o tratamento de desordens cutâneas. A utilização popular de plantas, como a *Malva sylvestris* para o tratamento de doenças cutâneas, sinaliza para uma possível e promissora ferramenta no tratamento de doenças inflamatórias da pele.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia farmacológica e toxicidade do extrato etanólico *M. sylvestris* no tratamento de disfunções da pele em diferentes modelos, por distintas vias de administração e formas farmacêuticas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a efetividade anti-inflamatória do extrato etanólico da *M. sylvestris* através das vias de administração tópica e oral;
- Verificar a eficácia anti-inflamatória do extrato etanólico da *M. sylvestris* em preparações diferentes para aplicação tópica, como creme e gel;
- Analisar se o extrato etanólico da *M. sylvestris* apresenta ação anti-inflamatória frente a estímulos flogísticos de origem infecciosa e irritativa;
- Avaliar o efeito do extrato etanólico *M. sylvestris* em modelo crônico de inflamação cutânea;
- Verificar a eficácia e mecanismo de ação do extrato etanólico da *M. sylvestris* com potencial atividade para o tratamento de distúrbios de pigmentação da pele;
- Avaliar a segurança do extrato etanólico da *M. sylvestris* com potencial atividade para o tratamento de disfunções da pele.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Detalhamento das atividades desenvolvidas

4.1.2 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da variedade *Swiss* (25 a 35 g), fêmeas, exceto para os ensaios de genotoxicidade que foram utilizados machos, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB-UFPR. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada (22 ± 2 °C), respeitando uma fase claro/escuro de 12 horas e com livre acesso a água e ração comercial. No mínimo uma hora antes da realização dos experimentos, os animais foram transferidos e mantidos na sala de experimento para adaptação. Os experimentos foram realizados de acordo com as orientações para os cuidados com animais de laboratórios (CEEA, 2003) e de acordo com as diretrizes ARRIVE (Guia de condução de pesquisas em animais) (KILKENNY *et al.*, 2010), e após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob o protocolo de número 760.

1.1.3 4.1.3 Linhagens celulares e manutenção das células

Para a realização dos experimentos foram utilizadas linhagens celulares de fibroblasto de camundongo (3T3, ATCC® CRL-1658™), melanócito de melanoma de camundongo (B16F10, ATCC® CRL-6475™), e queratinócito humano (HaCaT), cedidas pelo Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr. da Universidade de São Paulo (USP).

As células foram mantidas rotineiramente em garrafas de cultivo contendo meio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 µg/mL de estreptomicina e 10 U/mL de penicilina, em atmosfera umidificada a 37 °C e 5% de CO₂. Para manutenção das células o meio foi trocado a cada 48 h. No momento em que a monocamada celular se tornava subconflente, as células foram incubadas com 1,5 mL de tripsina 0,25% durante 5 min à 37 °C. Apenas as células HaCaT antes de serem tripsinizadas foram lavadas e incubadas durante 10 min com etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM. Após o despreendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com DMEM

acrescido de 10% de SFB e a suspensão celular obtida foi dividida em várias garrafas para subcultivo.

1.1.4 4.1.4 Obtenção do Extrato

O extrato EE da *M. sylvestris* foi preparado pelo próprio grupo de pesquisa, seguindo metodologia descrita por Cutillo *et al.* (2006). Estudos anteriores mostraram que, entre quatro métodos diferentes de extração da *M. Sylvestris* (maceração, *soxhlet*, infusão e turbólise), o melhor método foi o de extração por maceração, pois mostrou maior atividade biológica em menores doses testadas (0,1 mg/orelha, camundongos Swis) (BENSO, 2012), e foi o método selecionado para este trabalho.

O material botânico (folhas secas da *M. sylvestris*) foi adquirido por meios comerciais da empresa Quimer Medicinal Herbs (São Paulo, SP, BR). Este material foi devidamente identificado por comparação de características morfo anatômicas de acordo com a monografia da Farmacopéia (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000; PRUDENTE *et al.*, 2013) e comparadas com a excicata MBM384458, depositada por Cleverson A. F. Martins, no Museu Botânico Municipal de Curitiba, Paraná –BR, confirmando que o material adquirido pertencia a *M. sylvestris* L.

Assim, segundo a metodologia descrita por Cutillo *et al.* (2006) com modificações, as folhas secas de *M. sylvestris* (3 kg) foram trituradas e expostas à extração exaustiva por quatro vezes, por maceração em Etanol 96% P.A., sendo o volume de álcool três vezes superior ao volume de folhas secas, em temperatura ambiente e sob o abrigo de luz durante uma semana. Após a extração, o macerado foi mantido em repouso durante uma semana a 4° C. O extrato obtido foi filtrado e concentrado em um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 50 °C a 1/3 do seu volume original. O extrato etanólico obtido foi liofilizado e mostrou um rendimento de 200,6 g (6,68%) (CUTILLO *et al.*, 2006; PRUDENTE *et al.*, 2013).

Para as formas farmacêutica utilizadas segue abaixo a metodologia de preparação de cada dose e/ou concentração.

Formas Farmcêuticas para aplicação *in vivo* do EE da *M. sylvestri*:

*** Gel a 1%**

- gel de Natrosol q.s.p. 2 g

*** Gel a 5%**

- gel de Natrosol q.s.p. 2 g

- 20 mg de extrato

- 100 mg de extrato

O extrato foi adicionado a um graal e homogeneizado com o auxílio de um pistilo. Em seguida o gel de Natrozol foi adicionado aos poucos e homogeneizado com o pistilo até que estivesse totalmente incorporado ao gel.

*** Creme a 1%**

- creme básico (não iônico) q.s.p. 2 g

- 20 mg de extrato

- 200µL de propilenoglicol

*** Creme a 5%**

- creme básico (não iônico) q.s.p. 2 g

- 100 mg de extrato

- 200µL de propilenoglicol

O extrato foi adicionado a um graal e homogeneizado com o auxílio de um pistilo, em seguida o propilenoglicol foi adicionado aos poucos e homogeneizado com o pistilo até estar totalmente solubilizado. O creme foi adicionado aos poucos com o auxílio de uma espátula e homogeneizado até que o extrato ficasse totalmente incorporado ao creme.

*** Solução para utilização por via oral**

- Para as doses utilizadas por via oral, o extrato foi solubilizado em solução fisiológica (0,9% NaCl) de forma que o volume final, aplicado por gavagem ao animal, estivesse nas concentrações finais de 0,5, 30, 100 e 300 mg/kg.

*** Aplicação direta**

- Para as doses de aplicação tópica sem formulação (gel ou creme), o extrato foi diluído em Acetona PA, porque este solvente evapora instantaneamente. A solução para dose utilizada de 1 mg/orelha, foi preparada de forma que ao final fosse possível aplicar 20 uL de solução por orelha de cada animal.

4.1.5 Drogas e Reagentes

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizados: Etanol absoluto (P.A.), polietilenoglicol 400, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), cloreto de sódio, metanol, fosfato de sódio, ácido clorídrico, Triton X-100, Tris-HCl, dimetilsulfóxido (DMSO), hidróxido de sódio (NaOH) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). Acetona (PA), ácido EDTA, formaldeído, ácido acético glacial (PA), peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

(Merck Biosciences, Alemanha). Dexametasona, 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), DMEM, Lipopolossacarídeo (LPS), Vermelho neutro (VN) e L-tirosina (Sigma-AldrichCo., USA). Soro fetal bovino (SFB), tripsina (Cultilab, Campinas, Brasil) e estreptomicina/penicilina (Gibco, Life Technologies Corporation, USA). Acetato de dexametasona creme 1,0 mg/g (Tauto). Agarose (UltraPure™ Agarose - cat- 16500-100), Agarose de baixo ponto de fusão (LMP) (UltraPure™ Agarose Low Melting Point - cat-15517-014) e brometo de etídio (Invitrogen). Gel de Natrosol, creme não iônico, Ácido fólico (farmácia de manipulação). *Imiquimod* 5% (IMQ, Germed Farmaceutica LTDA, Hortolândia, SP).

4.1.6 Ensaios de Viabilidade celular.

4.1.6.1 *Thiazolyl blue tetrazoliumbromide* - MTT

Este método *in vitro* baseia-se na atividade de enzimas redutases mitocondriais que reduzem o anel tetrazólio do MTT a formazan púrpura. Assim, a intensidade da cor (absorbância) é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN, 1983; REILLY *et al.*, 1998).

O ensaio do MTT foi realizado de acordo com Tada *et al.* (1986), com algumas modificações (TADA *et al.*, 1986), nas três linhagens celulares propostas (fibroblasto de camundongo (3T3), melanócito de melanoma de camundongo (B16F10), e queratinócito humano (HaCaT)). Primeiramente 1×10^5 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h, o meio foi removido e os poços lavados 2 vezes com PBS. Em seguida o EE *M. sylvestris* (0,03 à 100 µg/mL), assim como o veículo (Etanol 1%), preparados em meio DMEM (1% SFB), foram adicionados a cada poço. Após 24 h, o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS e a solução de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionada em cada poço (200 µL). Passadas 4 h, a solução de MTT foi removida e 200 µL de etanol 70° foi adicionado a cada poço, sendo a avaliação colorimétrica realizada em 570 nm de absorbância em leitor de microplacas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.1.6.2 Vermelho neutro

Este método permite verificar o acúmulo do corante VN (Vermelho de tolúileno, Vermelho básico 5, ou C.I. 50040; de fórmula $C_{15}H_{17}ClN_4$) nos lisossomos das células, sendo utilizado com o objetivo de verificar a viabilidade através da capacidade de fagocitar este corante. Após a lise celular, o corante em solução pode ser mensurado por espectrometria e a capacidade de fagocitose celular constatada (BORENFREUND e PUERNER, 1985; FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Da forma semelhante ao ensaio do MTT, as três linhagens celulares propostas (fibroblasto de camundongo (3T3), melanócito de melanoma de camundongo (B16F10), e queratinócito humano (HaCaT)) foram plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 h, o meio foi removido, os poços lavados 2 vezes com PBS e as diferentes concentrações do EE *M. sylvestris* (0,03 à 100 $\mu\text{g/mL}$), assim como do veículo (Etanol 1%), preparados em meio DMEM (1% SFB) e adicionados a cada poço. Após 24 h, o meio foi removido, os poços foram lavados com PBS e a solução de VN (50 mg/mL) foi adicionada em cada poço (200 μL), de acordo com Borenfreund e Puener (1985), com algumas modificações. Após 4 h, o meio foi removido e 100 μL do fixador (formaldeído 1%), foi adicionado em cada poço. Posterior a remoção do fixador, 200 μL de uma solução composta por 10 μL de ácido acético glacial, 500 μL de etanol 99%, e 490 μL de água destilada foi adicionada em cada poço, seguido de agitação. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 540 nm usando o leitor de microplaca (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.1.7 Quantificação do conteúdo de melanina

A influência do extrato na produção de melanina em linhagem de melanócitos foi avaliada através da quantificação de melanina, sendo utilizado o método descrito por Tsuboi *et al.* (1998) (TSUBOI *et al.*, 1998).

Células foram adicionadas em placas de 24 poços na densidade de 4×10^4 células/poço. Após 24 h, o meio DMEM 10% foi removido e as células foram lavadas com PBS. As diferentes concentrações do extrato (0,1; 0,3, 1 e 3 $\mu\text{g/mL}$), ou ácido kójico 1 mM (droga de referência), foram adicionadas nos poços e incubados por 4 dias a 37 °C em 5% CO_2 , em atmosfera umidificada. Após esse tempo, o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e 500 μL de uma solução NaOH 1 N

com 10% de DMSO foi adicionada a placa, sendo, posteriormente, mantida em estufa por 1 h a 80 °C. O conteúdo relativo de melanina foi determinado através da mensuração da absorbância a 470 nm no leitor de microplacas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.1.8 Avaliação da atividade da enzima tirosinase

A tirosinase é a enzima passo limitante para biossíntese de melanina, assim a sua atividade enzimática, tendo a *L*-tirosina como substrato, foi determinada espectrofotometricamente pelo método descrito por Hyun *et al.* (2008), com pequenas modificações (HYUN *et al.*, 2008).

Segundo o protocolo experimental, 10 µL de cada concentração do extrato (0,1; 0,3, 1 e 3 µg/mL) e 20 µL de tirosinase de cogumelo (500 U/mL), em tampão fosfato 50 mM (pH 6,5), foram adicionados a 170 µL de uma mistura contendo a proporção 10:10:9, de uma solução de *L*-tirosina 1 mM, tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,5) e água destilada em uma microplaca de 96 poços. O ácido kójico a 1 mM, droga de referência, foi utilizado como grupo controle positivo da metodologia pois é inibidor da atividade desta enzima. Após a incubação da mistura a 37 °C por 30 min, a absorbância foi medida em 490 nm utilizando um leitor de microplacas (EL808B, BioTech Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

4.1.9 Avaliação Genotóxica

Estudos de genotoxicidade são testes, *in vivo* e *in vitro*, utilizados para detectar o potencial das substâncias (fármacos, extratos, entre outros) ou alteração ambiental (por exemplo: estresse) em causar mutações genéticas e cromossômicas (BRASIL, 2010a).

4.1.9.1 Escolha do Método

Antes da realização do Ensaio Cometa e o Ensaio do Micronúcleo (MN) foi realizada uma revisão sistemática, objetivando o levantamento sobre quais técnicas são utilizadas com mais frequência para avaliação de possível atividade genotóxica de extratos de plantas medicinais. Esta revisão foi composta de artigos originais publicados no período de 2000 a fevereiro (dia 4) de 2015, nas seguintes bases de

dados: *Medline* (através do *Pubmed*), *Science Direct*, *Web of Science* (através do *ISI Web of Knowledge*), *Scopus* e *Lilacs*. Uma busca abrangente foi conduzida utilizando as seguintes palavras-chaves “*medicinal plants*”, “*genotoxicity*” e “*mutagenicity*” e seus termos *MeSH*, para o *Medline* (através do *Pubmed*) a estratégia de busca foi (“*mutagenicity tests* “[*MeSH Terms*] OR (“*mutagenicity*”[*All Fields*] AND “*tests*”[*All Fields*]) OR “*mutagenicity tests* “[*All Fields*] OR (“*genotoxicity*”[*All Fields*] AND “*testing*”[*All Fields*]) OR “*genotoxicity testing*”[*All Fields*] AND (“*plants, medicinal*”[*MeSH Terms*] OR (“*plants*”[*All Fields*] AND “*medicinal*”[*All Fields*]) OR “*medicinal plants*”[*All Fields*] OR (“*medicinal*”[*All Fields*] AND “*plants*”[*All Fields*]))), para *Science Direct* e *Scopus* foi (“*mutagenicity tests*” OR (“*mutagenicity*” AND “*tests*”) OR (“*genotoxicity*” AND “*testing*”) OR “*genotoxicity testing*”) AND (“*plants, medicinal*” OR (“*plants*” AND “*medicinal*”) OR “*medicinal plants*” OR (“*medicinal*” AND “*plants*”))), para *Web of Science* (através do *ISI Web of Knowledge*) foi (*TS*=(“*mutagenicity tests*” OR (“*mutagenicity*” AND “*tests*”) OR (“*genotoxicity*” AND “*testing*”) OR “*genotoxicity testing*”) AND *TS*=(“*plants, medicinal*” OR (“*plants*” AND “*medicinal*”) OR “*medicinal plants*” OR (“*medicinal*” AND “*plants*”))) OR (*TI*=(“*mutagenicity tests*” OR (“*mutagenicity*” AND “*tests*”) OR (“*genotoxicity*” AND “*testing*”) OR “*genotoxicity testing*”) AND *TI*=(“*plants, medicinal*” OR (“*plants*” AND “*medicinal*”) OR “*medicinal plants*” OR (“*medicinal*” AND “*plants*”))), e para *Lilacs* foi (“*mutagenicity tests*” OR (“*mutagenicity*” AND “*tests*”) OR (“*genotoxicity*” AND “*testing*”) OR “*genotoxicity testing*”) AND (“*plants, medicinal*” OR (“*plants*” AND “*m*(“*mutagenicity tests*” OR (“*mutagenicity*” AND “*tests*”) OR (“*genotoxicity*” AND “*testing*”) OR “*genotoxicity testing*”) AND (“*plants, medicinal*” OR (“*plants*” AND *medicinal*”) OR “*medicinal plants*” OR (“*medicinal*” AND “*plants*”))) AND *db*:("LILACS").

Os critérios de inclusão foram artigos originais que utilizavam técnicas de genotoxicidade para avaliar extrato bruto de plantas medicinais, apenas artigos publicados em Inglês, Espanhol ou Português. Os critérios de exclusão foram artigos de revisão; artigos que não utilizavam técnicas de genotoxicidade; que utilizavam compostos, formulações, misturas de extrato de plantas e frações isoladas de extrato de plantas medicinais. A fim de assegurar a coerência e reprodutibilidade do processo, foram consideradas as recomendações da *Cochrane Collaboration and PRISMA statement* (LIBERATI *et al.*, 2009; HIGGINS e GREEN, 2011) para revisões sistemáticas.

Os artigos encontrados pela estratégia de busca foram avaliados por dois revisores independentes os quais primeiramente fizeram uma pré-seleção pelos títulos e resumos, incluindo-os de acordo com os critérios de inclusão. Na sequência, os artigos selecionados inicialmente, foram cuidadosamente avaliados e excluídos, ou mantidos na revisão. Os dados relativos aos ensaios de genotoxicidade descritos nos artigos, foram extraídos e analisados de forma descritiva. Esta revisão esta em processo de publicação.

4.1.9.2 Ensaio Cometa

O princípio da técnica baseia-se no fato de o DNA intacto, ou seja, da célula que não tiver dano, migrará em conjunto durante a eletroforese, formando um círculo. Caso ocorram danos ao DNA, serão formados fragmentos de diversos tamanhos, sendo que os fragmentos menores tendem a migrar mais rapidamente do que os maiores durante o ensaio. Ocorrendo um dano muito intenso na célula, muitos fragmentos, de diversos tamanhos, serão formados e migrarão em velocidades diferentes, formando então, a figura típica de um cometa (OLIVE *et al.*, 1990).

A eletroforese em gel de célula única, ou mais conhecida como Ensaio Cometa, foi realizada de acordo com o método modificado de Singh *et al.* (1988).

Para este estudo, foi necessário a obtenção de um homogenato celular como descrito abaixo.

In vitro – obtenção do homogenato celular

A cultura celular para este ensaio foi estabelecida em placa contendo poços de 10 cm², aos quais foi plaqueado uma densidade mínima de 1 x 10⁵ células por poço. Após 48 h, o meio foi retirado, o poço contendo as células lavado 2 vezes com PBS, e os tratamentos com as diferentes concentrações do EE da *M. sylvestri* (0,03 à 100 µg/mL), controle positivo (H₂O₂, 100 µM) da técnica (BOUHLEL; KILANI; *et al.*, 2008; BOUHLEL; VALENTI; *et al.*, 2008), assim como o veículo (Etanol 1%), foram preparadas em meio DMEM (1% de SFB) e adicionadas a cada poço. O controle negativo do ensaio foram poços contendo apenas DMEM (1% SFB), a Tabela 2 apresenta simplificada cada grupo deste ensaio. Após 2 h, o meio foi removido e as células foram submetidas a tripsina para soltar, por 3 min a 37 °C, centrifugadas

(1000 rpm) por 5 min, o sobrenadante foi descartado e adicionado meio DMEM (10% SFB), assim neutralizando a ação da tripsina remanescente. A solução foi centrifugada por 5 min, o sobrenadante descartado, e as células ressuspensas.

Tabela 2 – Desenho experimental para cada tratamento de cultura celular

Grupo	N. de poços com 10cm ²	Tratamento/Desenho experimental
1	3	Controle negativo (só células sem ativo, extrato, e ou substância, em meio DMEM (1% SFB)) pelo mesmo tempo de experimento (2h).
2	3	Controle positivo com H ₂ O ₂ , 100 µM (BOUHLEL; KILANI; <i>et al.</i> , 2008; BOUHLEL; VALENTI; <i>et al.</i> , 2008) no meio incompleto (sem soro), pelo mesmo tempo de experimento (2h) (RAMKUMAR <i>et al.</i> , 2010).
3	3	Tratamento EEMS concentração final 0,03 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
4	3	Tratamento EEMS concentração final 0,1 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
5	3	Tratamento EEMS concentração final 0,3 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
6	3	Tratamento EEMS concentração final 1 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
7	3	Tratamento EEMS concentração final 3 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
8	3	Tratamento EEMS concentração final 10 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
9	3	Tratamento EEMS concentração final 30 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
10	3	Tratamento EEMS concentração final 100 µg/mL em meio DMEM (1% SFB).
11	3	Tratamento Etanol 1% (Veículo) concentração final em meio DMEM (1% SFB).

EEMS – Extrato etanolico *M. Sylvestris*. SFB – Soro Fetal Bovino.

Quando se optou por avaliar o potencial de proteção e/ou recuperação ao dano ao DNA, os melanócitos (B16F10) foram expostas por 2 h a H₂O₂ (100 µM, agente indutor do dano ao DNA), antes e/ou depois do tratamento com o EE *M. sylvestris*. Para este ensaio *in vitro* os experimentos foram realizados em triplicata, e para cada grupo de tratamento foi utilizado um N. de 3 poços, a Tabela 3 apresenta simplificadaamente cada grupo deste ensaio de proteção e recuperação do dano ao DNA realizado.

Tabela 3 – Desenho experimental para cada tratamento da cultura de melanócitos, para avaliar o potencial de proteção e recuperação ao dano do DNA.

Grupo	N. de poços com 10cm ²	Tratamento/Desenho experimental
1	3	Controle negativo (só células sem ativo, extrato, e ou substância, em meio DMEM (1% SFB)) pelo mesmo tempo de experimento (2h).
2	3	Controle positivo com H ₂ O ₂ , 100 uM (BOUHLEL; KILANI; <i>et al.</i> , 2008; BOUHLEL; VALENTI; <i>et al.</i> , 2008) no meio incompleto (sem soro), pelo mesmo tempo de experimento (2h) (RAMKUMAR <i>et al.</i> , 2010).
3	3	Tratamento Etanol 1% (Veículo) concentração final em meio DMEM (1% SFB).
Proteção		
4	3	Tratamento EEMS concentração final 0,3 ug/mL em meio DMEM (1% SFB), após 2h com esse tratamento inicial, tratar com H ₂ O ₂ , 100 uM no meio incompleto (sem soro) (expor + 2h)
5	3	Tratamento EEMS concentração final 1 ug/mL em meio DMEM (1% SFB), após 2h com esse tratamento inicial, tratar com H ₂ O ₂ , 100 uM no meio incompleto (sem soro) (expor + 2h)
6	3	Tratamento EEMS concentração final 3 ug/mL em meio DMEM (1% SFB), após 2h com esse tratamento inicial, tratar com H ₂ O ₂ , 100 uM no meio incompleto (sem soro) (expor + 2h)
Recuperação		
7	3	Tratamento com H ₂ O ₂ , 100 uM no meio incompleto (sem soro), após 2h com esse tratamento inicial, tratar com EEMS concentração final 0,3 ug/mL em meio DMEM (1% SFB) (expor + 2h)
8	3	Tratamento com H ₂ O ₂ , 100 uM no meio incompleto (sem soro), após 2h com esse tratamento inicial, tratar com EEMS concentração final 1 ug/mL em meio DMEM (1% SFB) (expor + 2h)
9	3	Tratamento com H ₂ O ₂ , 100 uM no meio incompleto (sem soro), após 2h com esse tratamento inicial, tratar com EEMS concentração final 3 ug/mL em meio DMEM (1% SFB) (expor + 2h)

EEMS – Extrato etanolico *M. Sylvestris*. SFB – Soro Fetal Bovino.

In vivo - obtenção do homogenato celular

Para a avaliação do potencial genotóxico sistêmico do EE *M. sylvestris*, por tratamento tópico, os animais foram separados em quatro grupos (n=6): (1) Naive - animais sem tratamento, (2) Controle positivo da técnica – onde os animais receberam

ciclofosfamida (50 mg/kg, i.p., tratamento único 24 horas antes da eutanásia), (3) Veículo – recebeu apenas acetona, e o (4) grupo tratado com EE *M. sylvestris* (1 mg/orelha). Os animais receberam seus respectivos tratamentos por 7 dias consecutivos, 2 vezes por dia (Fig. 5). Ao final do 7º dia os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical e o sangue e o fêmur foram coletados. O sangue foi coletado por punção cardíaca, e 1 a 2 gotas de sangue foram adicionadas a 1 mL de PBS (pH 7,4 a 4 °C) e reservado. O fêmur da pata traseira direita de cada animal foi removido cirurgicamente e a extremidade superior e inferior do fêmur foi retirada. Para obtenção da medula, utilizou-se uma seringa com agulha romba contendo 1 mL de PBS, possibilitando assim que a medula se desprendesse do fêmur para dentro de um microtubo. A suspensão foi centrifugada a 1000 rpm por 10 min, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi ressuspenso com 100 µL de PBS e reservado.

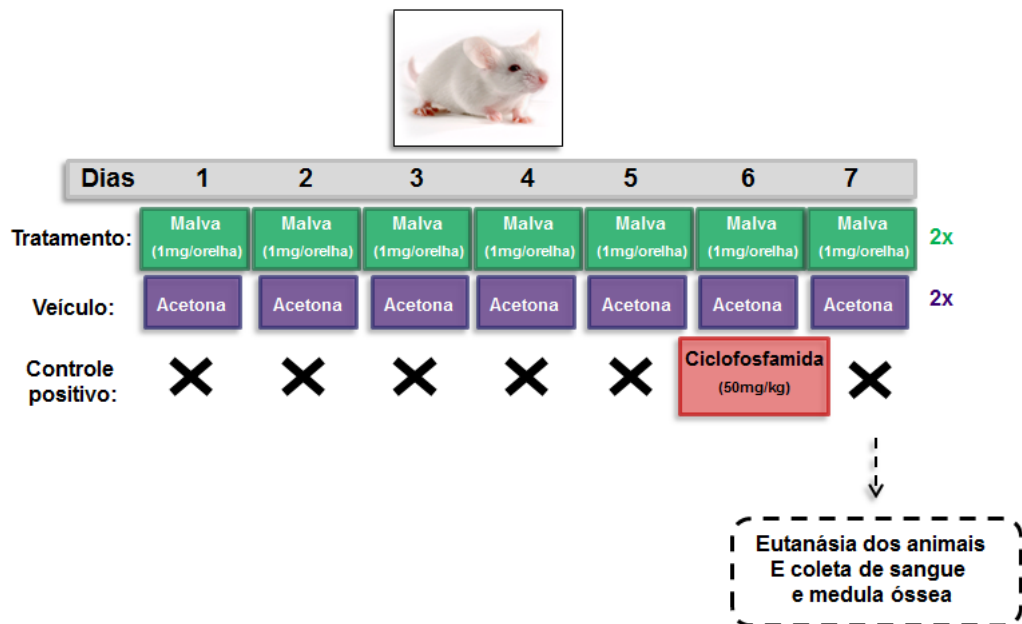


Figura 5. Delineamento experimental do modelo de genotoxicidade *in vivo*, com múltiplas aplicações do EE da *M. sylvestris*.

Eletroforese de célula única (SCGE): Ensaio Cometa

Uma alíquota (15 - 45 μL) do homogenato de células, obtido *in vivo* (medula óssea e sangue periférico) e *in vitro* separadamente, foi adicionado e homogeneizado em 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (LMP, 0,5% em PBS) a 37 °C e rapidamente espalhado em duas lâminas (por animal ou por poço), pré-revestidas com 1,5% de agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram protegidas da luz e resfriadas à 4 °C durante 20 min. Após a solidificação do gel, as lâminas foram imersas em solução de lise gelada (NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, pH 10, com 10% de DMSO e 1% de Triton X-100), durante 2 h a 4 °C. Após a lise, as lâminas foram colocadas lado a lado em cuba de eletroforese horizontal contendo tampão de eletroforese alcalina gelado (NaOH 1 mM, EDTA 300 mM, pH > 13) e deixadas na solução durante 20 min a 4 °C, para o desenrolamento do DNA e conversão dos sítios alcalinos lábeis em cadeia simples. A eletroforese alcalina foi realizada por 25 min, a 30 V (0,8 V/cm) e 300 mA à 4 °C. As lâminas foram então lavadas três vezes durante 5 min com tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) para remover o excesso alcalino. Finalmente, após secagem à temperatura ambiente e fixados em etanol gelado 100% durante 10 min, as lâminas foram secas e armazenadas durante 12 h, então coradas com 35 - 45 μL de brometo de etídio (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (SPEIT e HARTMANN, 1999). O material foi avaliado de imediato em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus DP72, Japan e Software Cell F) com um filtro de excitação de 515 a 560 nm e um filtro barreira de 590 nm. Apenas nucleóides individuais foram avaliados. A avaliação do dano no DNA já realizada pela relação entre o raio do nucleóides e a extensão das “caudas” formadas pelo DNA em migração (classificados como: Classe 0 – nenhum dano, Classe 1 – pouco dano, Classe 2 – médio dano, Classe 3 – Médio para máximo dano e Classe 4 – máximo dano) (Fig. 6) (COLLINS, 2004). Foram analisados 100 nucleóides por animal, assim o escore total foi no máximo de 400. Para o cálculo destes escores para cada tipo de dano determinado (0, 1, 2, 3, 4), foram atribuídos valores numéricos para cada grau de dano, de 0 a 4, respectivamente. Exemplificando: se houver 10 núcleos com dano 0, 20 com dano 1, 30 com dano 2, 20 com dano 3 e 20 com dano 4, terei um escore igual a 220 ((10 x 0) + 20 x1) + (30 x 2) + (20 x 3) + (20 x 4)) de intensidade de dano.

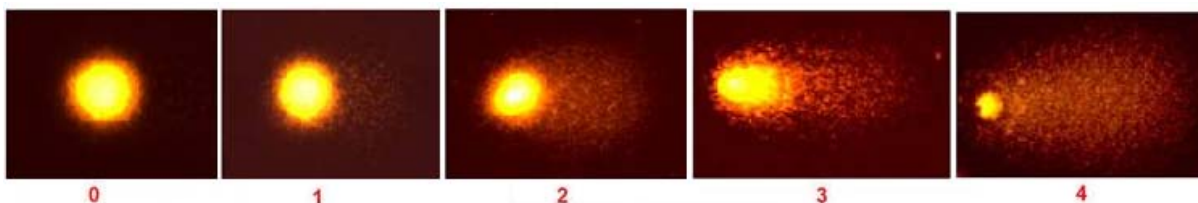


Figura 6. Imagem representativa das classes de dano no DNA observadas pelo Ensaio Cometa (BIRIMI, 2007).

4.1.9.3 Ensaio do Micronúcleo (MN)

O teste do micronúcleo é o ensaio, *in vivo* ou *in vitro*, amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (TAKAHASHI, 2004). Este teste foi desenvolvido inicialmente em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos (SCHMID, 1975), e subsequentemente, modificado por Heddle e colaboradores, que também estabeleceram a origem do micronúcleo (HEDDLE, 1973; HEDDLE, CIMINO et al., 1991).

Através do mesmo procedimento utilizado para realização do Ensaio Cometa, ao final do 7º dia os animais foram eutanasiados e o sangue coletado. Uma gota de sangue foi adicionada a uma lâmina limpa, sendo realizado um esfregaço. Para cada animal, foram preparadas duas lâminas. As lâminas foram secas em temperatura ambiente e, posteriormente, fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. Para coloração, as lâminas foram imersas em solução de tampão de coloração (1:1, com corante *Giemsa*) por 7-15 min, ou mais se preciso, até atingir a coloração adequada. Em seguida, foram deixadas para secar em temperatura ambiente. Foram analisados 2.000 eritrócitos normocromáticos (NCEs) de cada animal, em microscópio óptico acoplado a um scanner (Scanner Zeiss Axio Imagen Z2, Software Metafer 4, câmera Cool Cob 1 – Metasystems), em objetiva de imersão (100x), sendo caracterizadas e contadas as células micronucleadas (o micronúcleo pode atingir de 1/5 a 1/20 do tamanho do núcleo).

4.1.10 Avaliação do edema

O modelo de edema de orelha é um modelo animal de inflamação simples e prático, utilizado com frequência e de maneira satisfatória na avaliação do efeito anti-inflamatório de substâncias teste. Sendo empregado, especialmente, para a realização de estudos de processos inflamatórios característicos de doenças cutâneas, como, por exemplo, dermatites e psoríase. Dentre as vantagens desse modelo, destaca-se a economia da substância a ser testada, uma vez que, pequenas quantidades são suficientes para aplicação por via tópica. Além disso, o modelo fornece resultados rápidos e facilmente reproduzíveis (GABOR, 2000).

O edema de orelha foi expresso como o aumento da espessura (μm) da orelha, ou pata, dos camundongos (Δ Espessura = espessura final – espessura inicial), sendo avaliado na região próxima à extremidade medial da orelha direita, ou na região central da pata posterior direita, com o auxílio de um micrômetro digital (MT-045B, Shanghai Metal Great Tools Co., Ltd., Shanghai, China).

4.1.11 Dermatite de contato aguda induzida pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) na orelha

O TPA é um éster de forbol que quando aplicado sobre a pele é capaz de desencadear uma resposta inflamatória rápida e intensa, provocando aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente formação de edema e intenso infiltrado leucocitário (GABOR, 2000; GARG *et al.*, 2008). A resposta inflamatória aguda causada pelo uso tópico do TPA caracteriza-se pelo aparecimento de eritema, vasodilatação e edema, além da infiltração de neutrófilos para o tecido (STANLEY *et al.*, 1991; OTUKI *et al.*, 2005). Este agente flogístico é utilizado na avaliação de compostos com a atividade antiinflamatória, em modelo animal (OTUKI *et al.*, 2005; CHUN *et al.*, 2006; MURAKAWA *et al.*, 2006).

Assim, com o objetivo de avaliar o potencial anti-inflamatório do EE *M. sylvestris*, o processo inflamatório cutâneo agudo foi induzido pela aplicação de TPA [2,5 μg /orelha e (0,5%)]. O fármaco de referência dexametasona (0,5 mg/orelha, em acetona), e 0,5% (em creme), assim como as diversas concentrações e formulações testadas do EE *M. sylvestris* (Creme (1 a 5%), Gel (1 a 5%)), foram aplicadas logo em seguida à administração do agente flogístico nos grupos experimentais. Apenas quando o tratamento foi realizado por via oral (administração por gavagem), o EE *M. sylvestris* (0,5 a 300 mg/Kg) e a dexametasona (0,5 a 3 mg/kg) foram administrados 1

hora antes da indução da inflamação com o agente flogístico (TPA). Os veículos utilizados foram: acetona 90% (tópica), solução salina 0,9% (via oral), creme não iônico (tópico), gel de natrosol (tópico). A orelha tratada foi sempre a direita de cada camundongo, para minimizar variações referentes à técnica. A espessura da orelha foi verificada antes (basal) e 6 h após a indução do processo inflamatório.

4.1.12 Avaliação do edema de pata induzido pela aplicação de LPS

O LPS é um lipopolissacarídeo presente na membrana externa de bactérias gram-negativa. Ele é um componente que confere patogenicidade a este grupo de bactérias, sendo responsável por dificultar a neutralização por anticorpos e a ação de antibióticos, por exemplo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Desta forma, o modelo de edema de pata induzido pela administração de LPS é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico da substância teste (tratamento realizado por via oral), através da indução de um estímulo inflamatório local. Neste modelo, o edema é induzido pela administração intraplantar (i.pl.) de 50 µL de LPS (5 µg/pata), na pata posterior direita dos camundongos, adaptado de Levy (1969). Para avaliar o efeito sistêmico do EE *M. sylvestris* (30, 100 e 300 mg/kg), ou a dexametasona (3 mg/kg), foram administrados por via oral 1 hora antes da aplicação do agente indutor. Sendo a espessura da pata, da mesma forma que a espessura das orelhas nos modelos de edema, verificada antes (basal) e 1 hora após a indução do processo inflamatório.

4.1.13 Edema de orelha crônico induzido por Imiquimode (IMQ)

O IMQ é um imunomodulador que ativa os receptores *Toll-like* 7 e 8 (TLR7/8), portanto, um composto utilizado topicamente no tratamento de verrugas causadas pelo papiloma vírus humano (HPV). Contudo, alguns pacientes relataram que após o uso tópico prolongado de IMQ apareceram lesões psoriáticas na região da aplicação e em outros locais no corpo (WU *et al.*, 2004; FANTI *et al.*, 2006; RAJAN e LANGTRY, 2006). Frente às evidências, Van der Fits *et al.* (2009) caracterizaram o modelo de múltipla aplicação, com o objetivo de psoríase induzida pela aplicação tópica de IMQ em camundongos, ficando comprovada a validade desse modelo como

ferramenta de pesquisa em estudos pré-clínicos de drogas anti-psoriáticas (VAN DER FITS *et al.*, 2009).

Assim, o modelo do IMQ foi utilizado com o objetivo de avaliar a eficácia do EE *M. sylvestris* frente a um processo inflamatório crônico. Para isso, o creme comercial a base de *imiquimod* 5% (Germed Farmaceutica LTDA, Hortolândia, SP) foi aplicado na orelha direita dos camundongos, com auxílio de espátula (10 mg). A indução do processo inflamatório crônico foi realizada durante seis dias, uma vez ao dia, posterior à aferição do edema. Os tratamentos com EE *M. sylvestris* (5%, em creme não iônico), e a droga de referência, dexametasona em creme comercial (acetato de dexametasona, 0,5%), foram realizados 2 vezes ao dia, com início no 2º dia após a aplicação do IMQ (VAN DER FITS *et al.*, 2009) (Fig. 7). Ao final do sexto dia, foram retiradas amostras das orelhas para análises de atrofia cutânea, assim como alguns órgãos (baço, timo e adrenal), para avaliação de resposta imunossupressora, por meio da mensuração do peso destes órgãos. A espessura das orelhas foi medida diariamente, como descrito nos itens anteriores (AHN *et al.*, 2006).

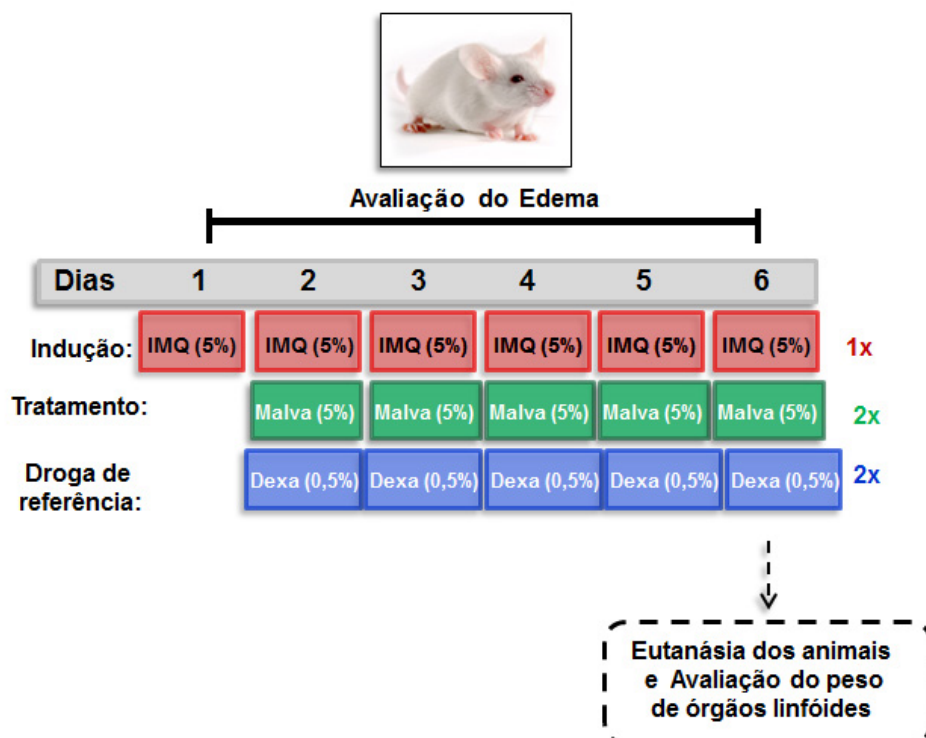


Figura 7. Delineamento experimental do modelo de edema de orelha induzido por múltiplas aplicações do IMQ.

4.1.14 Análises estatísticas

Os resultados serão apresentados como média \pm E.P.M. Os dados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de uma via e ou duas vias quando necessário, seguida do teste *post-hoc* de múltipla comparação de Newman-Keuls e (uma via) ou Dunnett. Valores de P menores do que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism version 6.0c, San Diego Califórnia, EUA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EE DA *M. sylvestris* IN VIVO

Com o intuito de verificar a segurança e avaliar a atividade anti-inflamatória do EE da *M. sylvestris*, administrado por via tópica ou por via oral, foi realizada a comparação dessas duas vias de administração *in vivo*, através do modelo agudo de inflamação (edema de orelha) induzido pela aplicação tópica de TPA (2,5 µg/orelha) (Fig. 5).

Os resultados obtidos mostraram que tanto a administração tópica quanto a por via oral do EE da *M. sylvestris* apresentaram atividade anti-inflamatória, uma vez que promoveram reduções significativas na formação do edema de orelha, quando comparados ao grupo controle, cujos animais receberam apenas TPA. O tratamento com malva por via tópica causou inibição na formação do edema de orelha dos animais em $83,07 \pm 11,79\%$, enquanto a administração do extrato por via oral (0,5 mg/kg) inibiu a formação do edema em $38,23 \pm 24,21\%$. Esses resultados mostram que o extrato da *M. sylvestris* possui eficácia independente da via de administração. Além disso, nas doses usadas, a via tópica se mostrou mais eficaz.

Os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores de Prudente et al. (2010 e 2013), nos quais o perfil anti-inflamatório tópico do EE da *M. sylvestris* (0,1 a 3 mg/orelha) já foi relatado, uma vez que o tratamento com o extrato foi capaz de reverter a formação do edema de orelha induzido pela aplicação de TPA em camundongos. Além disso, o estudo mostrou uma redução na migração leucocitária e níveis de IL-1 β teciduais induzidos pela aplicação deste agente flogístico (PRUDENTE, 2010; PRUDENTE *et al.*, 2013). Anterior a esses estudos, Conforti *et al.* (2008) demonstraram que o extrato hidroalcolico da *M. sylvestris* (300 µg/cm²) causou redução do edema de orelha (camundongo CD-1) induzido por óleo de cróton (CONFORTI; SOSA; MARRELLI; MENICHINI; STATTI; UZUNOV; TUBARO; LOGGIA, 2008).

O óleo de cróton, é uma mistura de lipídios extraídos da espécie vegetal *Croton tiglium* L. (Euphorbiaceae), frequentemente utilizado como agente flogístico, uma vez que, é capaz de promover resposta inflamatória bastante intensa, assemelhando-se a

algumas doenças cutâneas. Um de seus principais componentes é o TPA (GABOR, 2000). O TPA é um éster de forbol, cuja aplicação tópica na pele causa uma série de alterações biológicas e bioquímicas, levando à ativação da via de metabolismo do ácido araquidônico, migração de neutrófilos para o tecido, e resposta inflamatória acentuada (JANG e PEZZUTO, 1998; GARG *et al.*, 2008). A resposta inflamatória aguda causada pelo uso tópico do TPA caracteriza-se por apresentar eritema, vasodilatação e edema, além da infiltração de células inflamatórias para o tecido. Estes processos são desencadeados pela ativação direta da proteína quinase C (PKC), uma família de enzimas responsáveis por ativar uma cascata de transdução de sinais celulares (STANLEY *et al.*, 1991; OTUKI *et al.*, 2005; GARG *et al.*, 2008). Desta forma, pelos resultados mostrarem que o extrato de *M. sylvestris* apresenta atividade antiedematogênica, assim como, existem dados na literatura demonstrando que a aplicação tópica (em diferentes doses) do EE da *M. sylvestris* foi capaz de reverter outros parâmetros inflamatórios como, migração celular e síntese de citocinas neste mesmo modelo, é possível confirmar que o extrato possui atividade anti-inflamatória interferindo com diferentes eventos.

Como esperado, a dexametasona, usada como droga de referência, inibiu significativamente a formação do edema após aplicação tópica (0,5 mg/orelha), com inibição de $90,22 \pm 12,84\%$. Eficácia semelhante foi observada após a administração por via oral (3 mg/kg), com redução de $73,29 \pm 38,34\%$ (Fig. 8). A dexametasona, é um glicocorticóide que promove seu efeito anti-inflamatório ao interagir com os receptor de glicocorticóide (GR), inibindo a expressão de vários genes inflamatórios responsáveis pela produção de citocinas, enzimas, receptores e moléculas de adesão (FRY *et al.*, 2007). Sabe-se que os glicocorticóides têm diversas funções, tais como anti-inflamatória, anti-mitótica, pró-apoptótica, vasoconstritora e imunomoduladoras. Estas propriedades estão intimamente associadas com a sua eficácia no tratamento de doenças da pele (AHLUWALIA, 1998). Esta droga foi escolhida como controle positivo, principalmente por responder bem aos modelos utilizados neste trabalho, de avaliação do efeito anti-inflamatório, e também para observar se o EE da *M. sylvestris* possui algum parâmetro semelhante de resposta, em especial de efeito adverso como: diminuição do peso das orelhas decorrente a diminuição da espessura da epiderme causada, alteração de órgãos linfóides como atrofia do timo, baço e linfonodos, assim

como a redução das adrenais, que serão discutidos na seção 5.3.1 (SCHÄCKE *et al.*, 2002; SCHOEPE *et al.*, 2006).

O grupo Naive (animais sem tratamento) e o grupo Veículo (creme não iônico para aplicação tópica e solução salina para via oral), mantiveram os valores basais do animal, sem alterar a espessura da orelha, dados não apresentados.

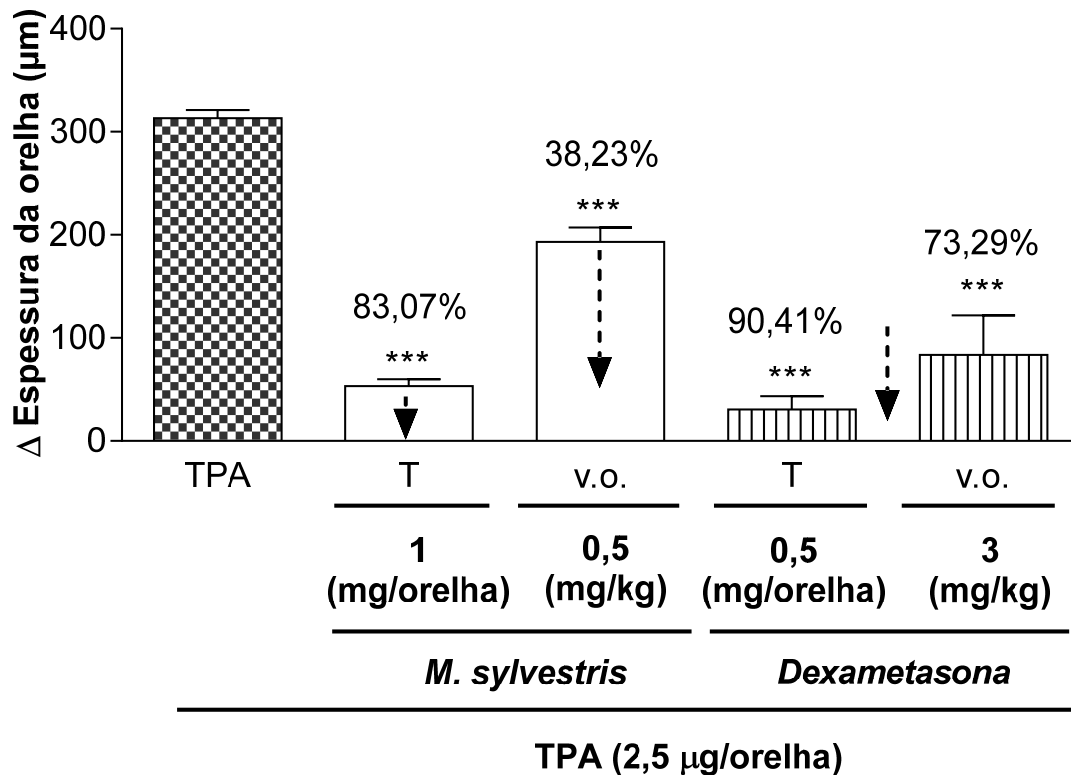


Figura 8. Avaliação da ação do EE da *M. sylvestris*, de aplicação por via tópica (T) e oral (v.o.), no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de TPA. A espessura das orelhas foi mensurada antes (basal) da indução e do tratamento e após 6 horas da aplicação do TPA. O tratamento por via oral foi realizado 1 hora antes da aplicação do TPA. Cada barra representa a média ± E.P.M. (n=5) do aumento da espessura da orelha. * Diferença significativa quando comparada ao TPA; ***P < 0,001/ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Uma vez que o principal objetivo desse estudo é auxiliar o desenvolvimento do uso da malva para doenças inflamatórias, a próxima etapa foi comparar a eficácia de duas formas farmacêuticas para uso por via tópica *in vivo* do EE da *M. sylvestris*, creme (1% e 5%) e gel (1% e 5%) (Fig. 9) através do modelo agudo de inflamação (edema de orelha) induzido por TPA (2,5 μg/orelha). Os resultados mostraram que ambas as formas farmacêuticas, nas duas doses testadas, apresentaram diferenças significativas com relação à redução na formação do edema de orelha quando

comparadas com o grupo controle (TPA), porém não obtivemos diferenças significativas quando comparamos a redução da formação do edema entre as formulações e suas doses. Desta forma, o tratamento com EE da *M. sylvestris* incorporado em creme foi capaz de inibir a formação do edema em $82,24 \pm 23,18\%$ e $80,44 \pm 12,88\%$ nas doses de 1% e 5%, respectivamente. De forma semelhante, o EE da *M. sylvestris* incorporado no gel reverteu a formação do edema de orelha em $81,75 \pm 25,73\%$ e $86,18 \pm 19,10\%$ nas doses de 1% e 5%, respectivamente. A droga de referência dexametasona (creme 0,5%) foi capaz de inibir a formação do edema de orelha em $95,62 \pm 20,64\%$.

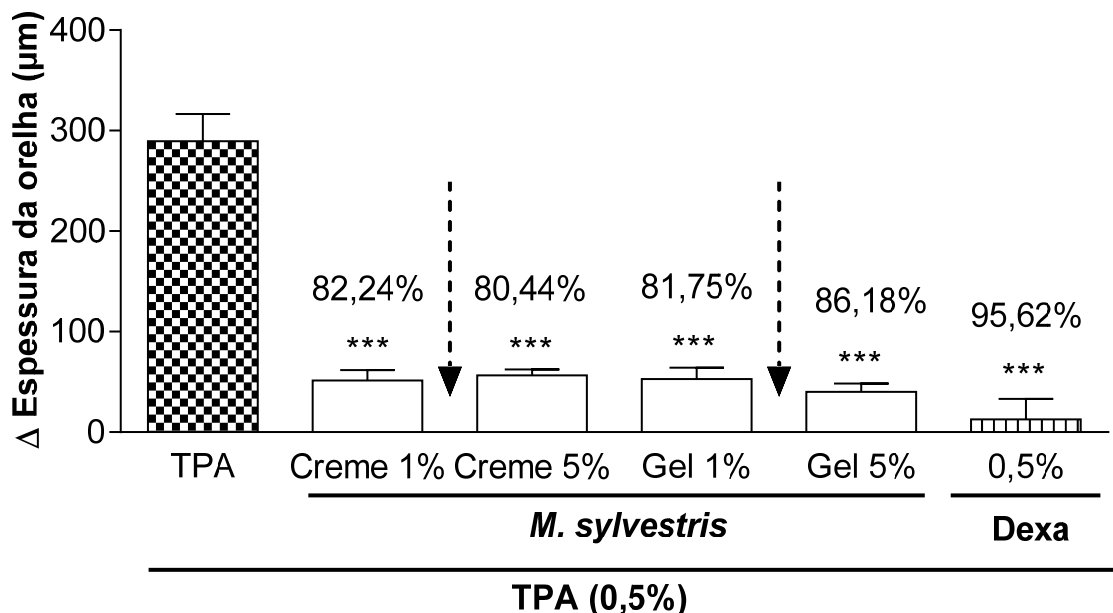


Figura 9. Avaliação da atividade anti-inflamatória do EE da *M. sylvestris* por via tópica em duas formas farmacêuticas (Creme e Gel) no edema de orelha induzido pelo TPA. A espessura das orelhas foi mensurada antes (basal) da indução e do tratamento e, após 6 horas da aplicação do TPA. Cada barra representa a média \pm E.P.M. (n=5). * Diferença significativa quando comparada ao TPA (controle); ***P < 0,001/ ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Contudo as formulações em creme são mais oclusivas e, conseqüentemente, favorecem o tratamento de desordens cutâneas, ajudando a melhorar a reparação da integridade cutânea, reduzindo, por exemplo, a perda transepidérmica de água (GRUBAUER *et al.*, 1989; WOOD *et al.*, 1992). Por outro lado o tratamento tópico também tem vantagens sobre o tratamento sistêmico, principalmente, quando se trata

de efeitos colaterais, em especial para afecções cutâneas crônicas, estes efeitos colaterais podem também levar a uma baixa adesão ao tratamento pelos pacientes (Maroti et al., 2006) (REICH *et al.*, 2014). A dermatite atópica é uma afecção que as vezes requer tratamento sistêmico, contudo, as respostas a este tipo de tratamento sistêmico são muitas vezes de curta duração, e a maioria dos pacientes exibe uma resposta clínica limitada, e, conseqüentemente, baixa adesão, assim a busca por um tratamento tópico, eficaz e seguro ainda se faz necessário (SCHAKEL *et al.*, 2014).

Com base nesses resultados obtidos que comprovam a eficácia da malva por diferentes vias de administração, decidiu-se explorar a ação anti-inflamatória em inflamação de origem infecciosa (bactéria) (Fig. 10). Os lipopolissacarídeos (LPS) são substâncias capazes de estimular uma resposta imune sendo, portanto, classificado como um padrão molecular associado à patógenos (PAMP) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Uma vez reconhecidos por receptores *Toll-like 4* (TLR4), presentes em macrófagos e células dendríticas, o LPS é capaz de desencadear diversas vias de sinalização intracelular, dentre elas a via do fator de transcrição nuclear *kappa*-B (NF- κ B) (CRUZ-MACHADO, 2010). Uma vez ativada, esta via é responsável por induzir a transcrição de citocinas inflamatórias, tais como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina 1 (IL-1) e Interleucina 6 (IL-6) (ROTH *et al.*, 2009; BLATTEIS *et al.*, 2005).

Assim, através do modelo agudo de edema de pata induzido pela injeção intraplantar (i.pl.) de LPS, foi verificado o efeito sistêmico do EE da *M. sylvestris* administrado por via oral (30 a 300 mg/kg). As doses de 100 mg/kg e 300 mg/kg apresentaram diferenças significativas, quando comparadas com o grupo LPS (controle positivo para atividade inflamatória), reduzindo a formação do edema em $48,41 \pm 116\%$ e $54,49 \pm 69\%$, respectivamente, porém não obtivemos diferenças significativas quando comparamos a redução da formação do edema entre as doses. Já a droga de referência dexametasona (0,5 mg/kg) inibiu o edema de pata em $53,39 \pm 35\%$. Novamente o extrato da *M. sylvestris* foi capaz de interferir com o processo inflamatório, independente da via de indução.

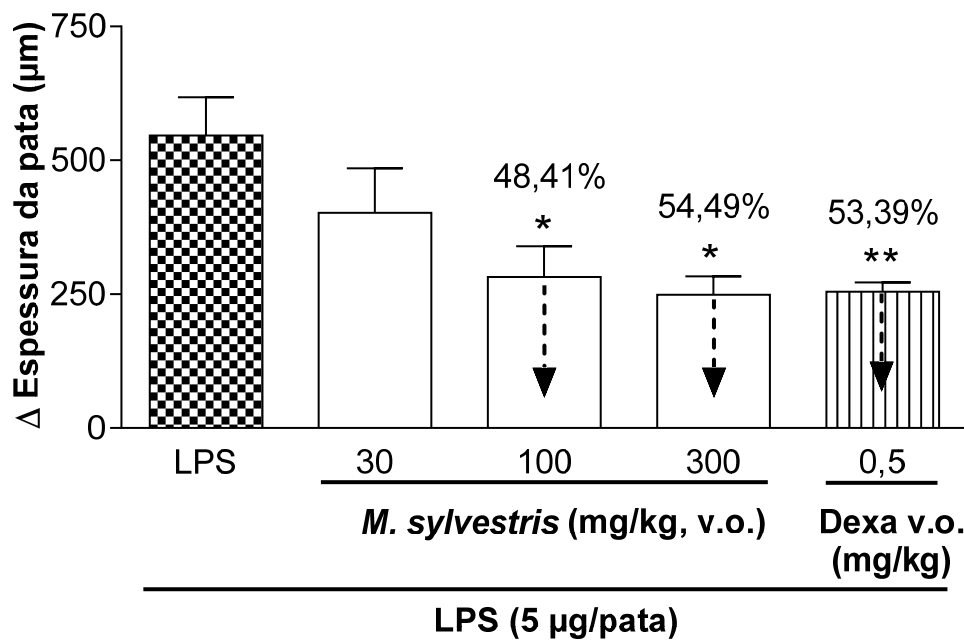


Figura 10. Avaliação da ação anti-inflamatória do EE da *M. sylvestris* administrado por via oral em modelo de edema de pata induzido por LPS. A espessura das orelhas foi mensurada antes (basal) da indução e do tratamento e após 1 hora da aplicação do LPS. O tratamento por via oral foi realizado 1 hora antes da aplicação do LPS. Cada barra representa a média \pm E.P.M. (n=5). * Diferença significativa quando comparada ao LPS (controle); *P < 0,05; **P < 0,01/ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Eficácia semelhante foi apresentada no estudo de Sleiman e Daher (2009). Eles demonstraram que o extrato aquoso da *M. sylvestris* (50 a 500 mg/kg, via oral) reduziu o edema de pata induzido pela injeção de carragenina em 60% (SLEIMAN e DAHER, 2009). Usando o mesmo modelo de inflamação induzida por carragenina, Chiclana *et al.* (2009) mostraram atividade anti-inflamatória tópica do extrato da *M. sylvestris* a 5% (CHICLANA *et al.*, 2009).

Benso (2012) mostrou que o EE da *M. sylvestris* (0,1 a 3 μ g/orelha) preparado com diferentes formas de extração (Soxhlet, Turbólise, Maceração), bem como usando diferentes concentrações etanólicas (80% a 100%), foi eficaz em reduzir o edema de orelha em camundongo, induzido por TPA. O resultado relevante apresentado por Benso (2012) mostrou que o EE da *M. sylvestris* (0,3 μ g/mL a 1 μ g/mL) reduziu os níveis de NO quando avaliado em células da linhagem 3T3 estimuladas com LPS, além de inibir a produção de citocinas próinflamatórias IL-1 β e TNF- α , mostrando potencial ação anti-inflamatória (BENSO, 2012).

Vale ressaltar ainda que Prudente (2010) demonstrou que o tratamento tópico com o extrato de *M. sylvestris* também foi capaz de reduzir a formação do edema de orelha mediado pela aplicação tanto de ácido araquidônico, quanto de oxazolona (PRUDENTE, 2010). O edema causado pelo ácido araquidônico simula uma dermatite atópica e psoríase (GÀBOR, 2000). Já a inflamação causada pela oxazolona simula uma dermatite alérgica de hipersensibilidade tardia, ou também conhecida como dermatite de contato alérgica (DCA), que envolve duas fases: a fase de sensibilização ou indução e a fase efetora (BAS *et al.*, 2007). Estes modelos se assemelham com as dermatites observadas em humanos (GÀBOR, 2000).

Logo, estes resultados reforçam as propriedades anti-inflamatórias atribuídas ao extrato da malva, uma vez que foi capaz de reverter diferentes eventos dos processos inflamatórios desencadeados por diferentes vias e agentes. Sugerindo que o extrato deve estar agindo em pontos comuns presentes nestes eventos inflamatórios. Assim, a questão seguinte buscou verificar o efeito do extrato da malva mediante um processo inflamatório crônico estabelecido com envolvimento de resposta imune, semelhante à psoríase, como o modelo de imiquimode (IMQ).

O imiquimode é um imunomodulador que ativa os receptores *Toll-like 7 e 8* (TLR7/8), levando a produção de citocinas do eixo IL-23/IL-17/IL-22, principais mediadores envolvidos no desenvolvimento da psoríase, doença caracterizada pelo estabelecimento de um processo inflamatório crônico (CAI *et al.*, 2011).

O uso de IMQ é aprovado para o tratamento de verrugas causadas pelo papiloma vírus humano (HPV), no qual é normalmente bem tolerado pelos pacientes. Entretanto, detectou-se o aparecimento de lesões psoriáticas em alguns pacientes após o tratamento contínuo e prolongado com IMQ tópico, o que levou ao estudo dos efeitos psoriáticos dessa droga (WU *et al.*, 2004; FANTI *et al.*, 2006; RAJAN e LANGTRY, 2006). Estudos demonstraram que as lesões induzidas por IMQ são relacionadas com eventos característicos da psoríase como, grande quantidade de células dendríticas plasmocitóides (pDC) e indução da atividade de interferon do tipo I (IFN-I) (GILLIET *et al.*, 2004).

Neste modelo, foram realizadas avaliações diárias da espessura da orelha dos animais, as quais mostraram que a aplicação de IMQ aumentou a espessura da orelha dos animais em todos os dias de avaliação, conforme observado no grupo controle que recebeu apenas IMQ (5%) (Fig. 11). A administração tópica de EE da *M.*

sylvestris (5%) foi capaz de inibir a formação do edema de maneira significativa desde o primeiro dia de tratamento, assim como a droga de referência dexametasona (0,5%) (Fig. 11).

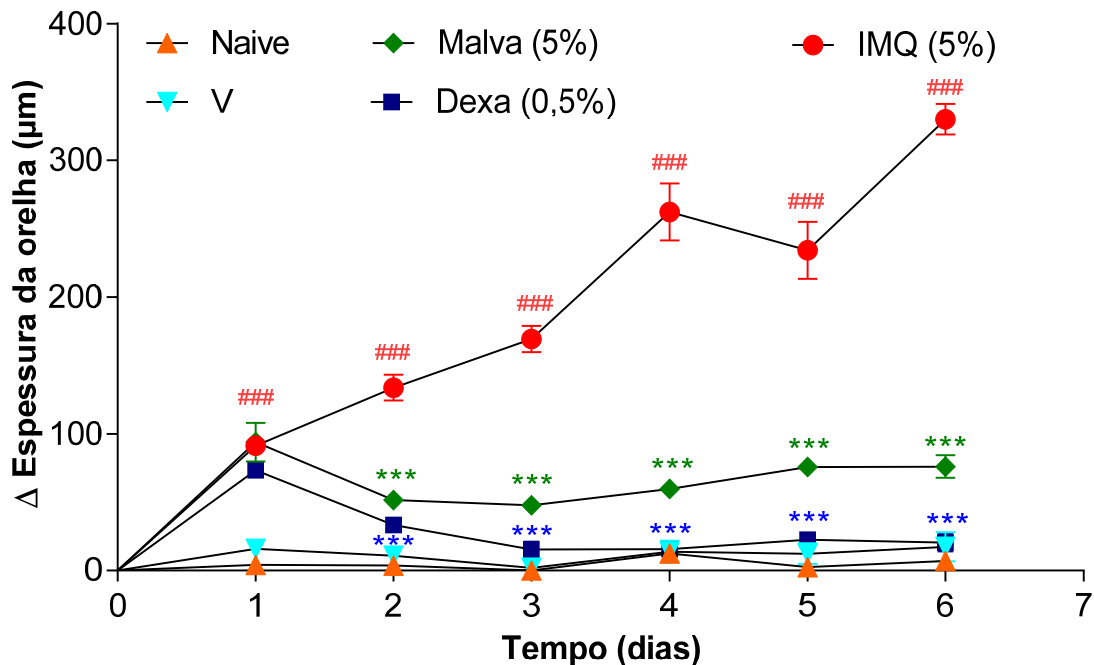


Figura 11. Efeito do EE da *M. sylvestris* em creme 5% (1 mg/orelha) no edema de orelha crônico induzido pela aplicação IMQ. A espessura das orelhas foi mensurada antes da indução com IMQ e, após ao tratamento diariamente. O IMQ foi aplicado em todos os 6 dias. O tratamento foi realizado a partir do segundo dia de aplicação do IMQ, duas vezes ao dia. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. (n=10). # Diferença significativa quando comparada com o Veículo. * Diferença significativa quando comparada IMQ (controle); ###P < 0,001, ***P < 0,001/ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Prudente (2013) demonstrou que a aplicação tópica do extrato da *M. sylvestris* (1 mg/orelha ou 5%) reduz o processo inflamatório no modelo de inflamação por múltiplas aplicações (8 dias) de TPA. Nesse estudo foi mostrado que além do edema, a malva também foi eficaz em interferir em outros parâmetros inflamatórios como a migração celular local, demonstrada pela inibição da enzima mieloperoxidase (MPO - estima a presença de leucócitos polimorfonucleares) e da enzima n-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG - estima a presença de células mononucleares), estas informações foram comprovadas com a redução da celularidade local, assim como da hiperplasia epidérmica, ambos por processamento histológico.

Sleiman e Daher (2009) também mostraram atividade anti-inflamatória do extrato aquoso da *M. sylvestris* (50 a 500 mg/kg, via oral) em modelo crônico de inflamação em rato, induzido por formalina.

A partir destes resultados, é possível inferir que a atividade anti-inflamatória apresentada pelo EE da *M. sylvestris* frente a modelos agudos de inflamação cutânea, se manteve em modelos que mimetizam doenças inflamatórias crônicas como a psoríase.

5.2 AVALIAÇÕES DA EFICÁCIA DO EXTRATO ETANÓLICO DA *M. sylvestris* IN VITRO

5.2.1 Avaliação da atividade melanogênica do EE da *M. sylvestris*

A avaliação da atividade melanogênica (produção de melanina) foi realizada através da mensuração da quantidade de melanina intracelular, em cultura de melanócitos da linhagem B16F10. Estas células, quando expostas ao EE da *M. sylvestris*, demonstraram redução na produção de melanina nas concentrações testadas: 0,1 µg/mL (46,22 ± 0,03%), 0,3 µg/mL (20,89 ± 0,001%), 1 µg/mL (14,0 ± 0,004%), 3 µg/mL (52,44 ± 0,026%), quando comparadas ao grupo controle negativo (células que não foram tratadas, somente com meio de cultura) (Fig. 12). O ácido kójico (droga de referência que reduz a produção de melanina, 1 mM), causou redução de 57,33 ± 0,031%.

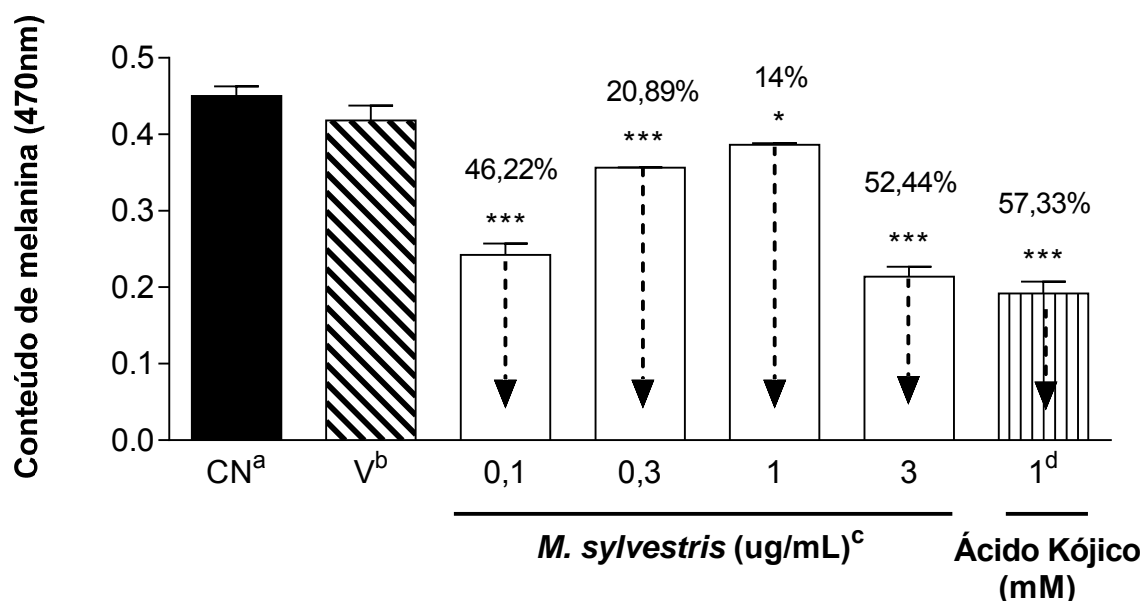


Figura 12. Ação do EE da *M. sylvestris* sobre a produção de melanina em cultura de melanócitos (B16F10). ^aControle negativo (só células), ^bVeículo (etanol 0,02%), ^cTratamento, e ^dDroga de referência (para redução de melanina). Proveniente de experimento em triplicata (n=3). O tratamento foi realizado no primeiro dia e, a quantificação de melanina foi realizada após 4 dias. * Diferença significativa quando comparada ao CN (células cultivadas apenas com meio de cultura); *P < 0,05; ***P < 0,001/ANOVA de uma via /Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Quando os melanócitos foram expostos ao EE da *M. sylvestris* e submetidos à avaliação da atividade da enzima tirosinase, enzima passo-limitante para biossíntese de melanina, foi observado o mesmo padrão de redução, com diferença significativa para as concentrações do extrato testadas [0,1 µg/mL (41,55 ± 0,011%), 0,3 µg/mL (27,22 ± 0,027%), 1 µg/mL (14,90 ± 0,027%), 3 µg/mL (35,82 ± 0,007%)] quando comparadas com o grupo controle (tirosinase + L-tirosina) (Fig. 13). O ácido kójico (1 mM) também foi capaz de reduzir a atividade da enzima tirosinase em 36,30 ± 0,006%, o que era esperado, uma vez que esta droga de referência atua diretamente na redução da atividade dessa enzima (XIE *et al.*, 2015).

O ácido kójico (5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona) é uma substância natural produzida por uma enorme variedade de microorganismos, principalmente fungos do gênero *Aspergillus* (BURDOCK *et al.*, 2001; NOHYNEK *et al.*, 2004). Do ponto de vista terapêutico, o ácido kójico tem sido amplamente utilizado em preparações dermocosméticas como agente clareador (UTHER, 1993) quelante de íons cobre, sendo esta última responsável pela inativação da tirosinase e, conseqüentemente,

pela ação inibidora na formação de melanina (DRAELOS, 2008). Porém, possui algumas desvantagens para utilização em preparações cosméticas (ZHOU *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2015), não atinge a eficácia desejada na promoção da despigmentação das áreas lesadas da pele, e assim como outros despigmentantes, pode ter ação não apenas local, mas na região da pele adjacente (JANG *et al.*, 2015).

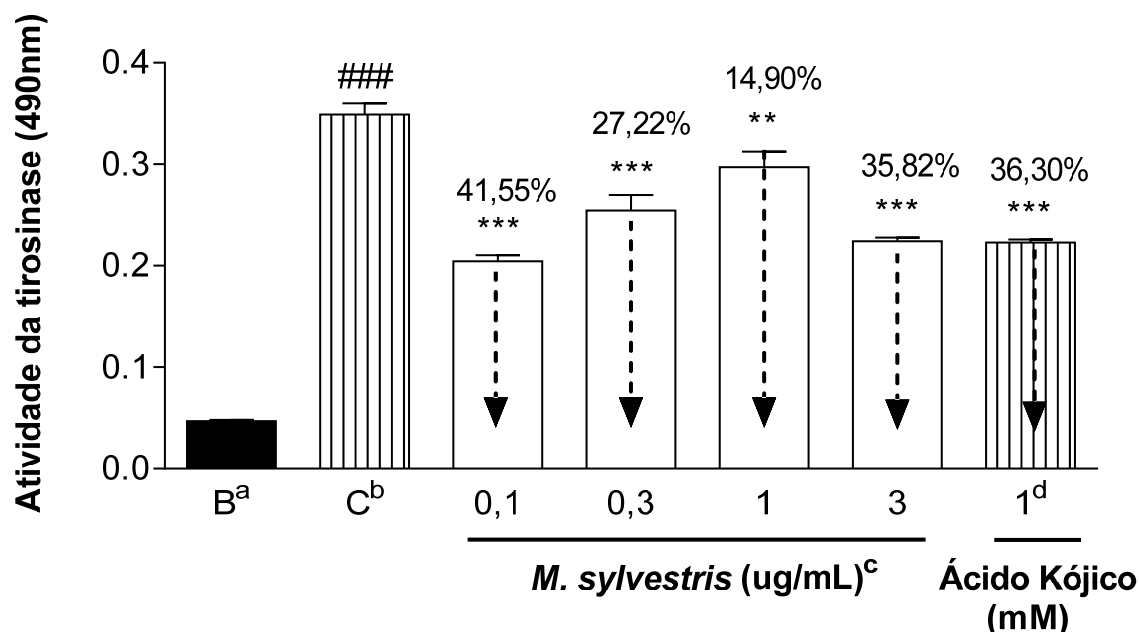


Figura 13. Efeito do EE da *M. sylvestris* sobre a atividade da enzima tirosinase *in vitro*. ^aBranco (somente a enzima sem substrato), ^bControle (enzima tirosinase com o seu substrato, a L-tirosina), ^cTratamento com EE *M. sylvestris*, e ^dDroga de referência (ácido kójico). Proveniente de experimento em triplicata (n=3). A quantificação da enzima foi realizada após 30 min do tratamento. * Diferença significativa quando comparada ao Controle; ### P < 0,001 (comparado com o grupo B), **P < 0,01, ***P < 0,001/ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Até o momento nenhum estudo avaliou a atividade melanogênica do EE da *M. sylvestris* ou de seus compostos isolados. Contudo, estudos com compostos da mesma classe dos encontrados no extrato da *M. sylvestres*, já foram descritos com potencial despigmentante, como alguns flavonóides (quercetina, quercetina 4'-O-b-glucoside) (MATCHETT *et al.*, 2005; ARUNG *et al.*, 2011; YAMAUCHI; MITSUNAGA; INAGAKI; *et al.*, 2015), cumarinas (KIM *et al.*, 2013) e antocianidina (malvidina) (CHOUNG *et al.*, 2013).

O extrato metanólico de *Rosa canina L.*, na concentração de 1 mg/mL também foi capaz de promover redução (49,1%) de melanina intracelular nas células B16F10

(FUJII e SAITO, 2009). Os resultados obtidos com EE da *M. sylvestris*, quando comparados com o extrato metanólico da *R. canina*, possuem em comum a presença da quercetina como um dos compostos majoritários (PRUDENTE *et al.*, 2013). Assim, pode-se sugerir que a atividade antimelanogênica da malva pode estar ligada em parte a flavonóides existentes no extrato. No entanto, esta especulação deve ser melhor investigada.

Diferentes lesões à pele (acne, picada de insetos, arranhões, ação de agentes surfactantes entre outros) levam à formação de um processo inflamatório, o qual poderia, posteriormente, induzir um processo de hiperpigmentação pós-inflamatória (HALDER *et al.*, 1983; HAKOZAKI *et al.*, 2010; ADALATKHAH e SADEGHI BAZARGANI, 2013). Esta hiperpigmentação ocasionada por estas lesões à pele pode ocorrer pela estimulação do processo de melanogênese, levando ao aumento na produção de melanina local (TOMITA *et al.*, 1992; COSTIN e HEARING, 2007; VIDEIRA *et al.*, 2013; JO *et al.*, 2014; IMEN *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015).

Este distúrbio de pigmentação local ocasionado pela elevada produção de melanina caracteriza como melasma. Estudos revelam que no melasma muitos mediadores inflamatórios estão expressos, quando em comparação com a pele normal adjacente (KIM *et al.*, 2007; MIOT *et al.*, 2009; PASSERON, 2013). O melasma também pode ser intensificado por alguns procedimentos cosméticos na pele (peeling, terapias com laser), que induzem a inflamação (NEGISHI *et al.*, 2004). Substâncias despigmentantes são recomendadas para o tratamento do melasma, e de outros distúrbios que envolvem hiperpigmentação da pele (KIM *et al.*, 2014; YAMAUCHI; MITSUNAGA; ITAKURA; *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2015).

Nesse contexto, de acordo com os resultados de eficácia deste estudo e com as evidências da literatura, pode-se sugerir que o EE da *M. sylvestris* é uma alternativa promissora, eficaz para o tratamento de distúrbios de pele como: inflamação cutânea, hiperpigmentação da pele. Ainda neste contexto, é possível supor que o efeito da malva em reduzir a produção de melanina pode estar relacionado com o efeito inibitório sobre a enzima tirosinase. Porém, estudos que avaliem o mecanismo de ação do EE da *M. sylvestris* no processo de melanogênese são necessários para reforçar estes dados.

5.3 AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DO EXTRATO ETANÓLICO DA *M. sylvestris*

5.3.1 Avaliação do possível efeito adverso do EE da *M. sylvestris* sobre o peso dos órgãos

Sabendo que a administração tópica de IMQ possui características imunomoduladoras, houve o interesse de avaliar possíveis alterações em órgãos dos animais submetidos a este modelo. Desta forma, no sexto dia de experimento os animais foram eutanasiados e o peso dos seus órgãos linfoides primário (timo) e secundário (baço) foi mensurado. Da mesma forma, foi avaliado o peso das orelhas dos animais com o objetivo de verificar indiretamente o exsudato plasmático, assim como o peso das adrenais, uma vez que estas são responsáveis por produzir o hormônio cortisol, que possui características imunossupressoras.

A partir das análises foi possível observar que a aplicação tópica de IMQ promoveu o aumento do peso das orelhas dos animais, caracterizando um aumento do exsudato plasmático e formação de edema, sustentando os resultados anteriores (Fig. 13), e o tratamento com o EE da *M. sylvestris* (5%) foi capaz de reduzir este parâmetro em $23,06 \pm 0,76\%$, assim como o tratamento com a dexametasona que reduziu em $56,28 \pm 0,47\%$. Um estudo anterior também demonstrou que o EE *M. sylvestris* (1 mg/orelha, tópico) reduziu o aumento do peso das orelhas em processo inflamatório induzido pela aplicação múltipla de TPA (PRUDENTE, 2013), um modelo semelhante ao do IMQ.

A avaliação do peso dos órgãos linfoides e adrenais mostrou que, durante a realização do modelo de inflamação crônica induzida por IMQ, o tratamento tópico com dexametasona promoveu alterações significativas no peso do timo (68,23%), baço ($42,26\% \pm 11,44\%$) e adrenais ($26,15\% \pm 0,59\%$) dos animais (Fig. 14 e 15). Estes dados caracterizam uma atividade imunossupressora semelhante a glicocorticoides. Já o tratamento tópico com o EE da *M. sylvestris* (5%) demonstrou atividade anti-inflamatória (reduzindo edema), mas sem alterar o peso dos órgãos linfoides e adrenais avaliados, indicando não apresentar um efeito colateral sistêmico pela aplicação tópica do extrato (Fig. 14 e 15). Esses resultados reforçam os dados apresentados por Prudente (2013), no qual através de duas metodologias: o ensaio *in vivo* de reversão por antagonista de receptores de glicocorticoide (RU-486 -

mifepristona), e ensaio *in vitro* de ligação específica ao receptor de glicocorticoide (^3H -dexametasona); verificou que o extrato da *M. sylvestris* não interage com receptor de glicocorticoide. Excluindo a possibilidade de que a atividade anti-inflamatória apresentada pelo extrato ocorra pela ativação desta via, ou seja, seu mecanismo de ação não é via receptor de glicocorticoides (PRUDENTE, 2013).

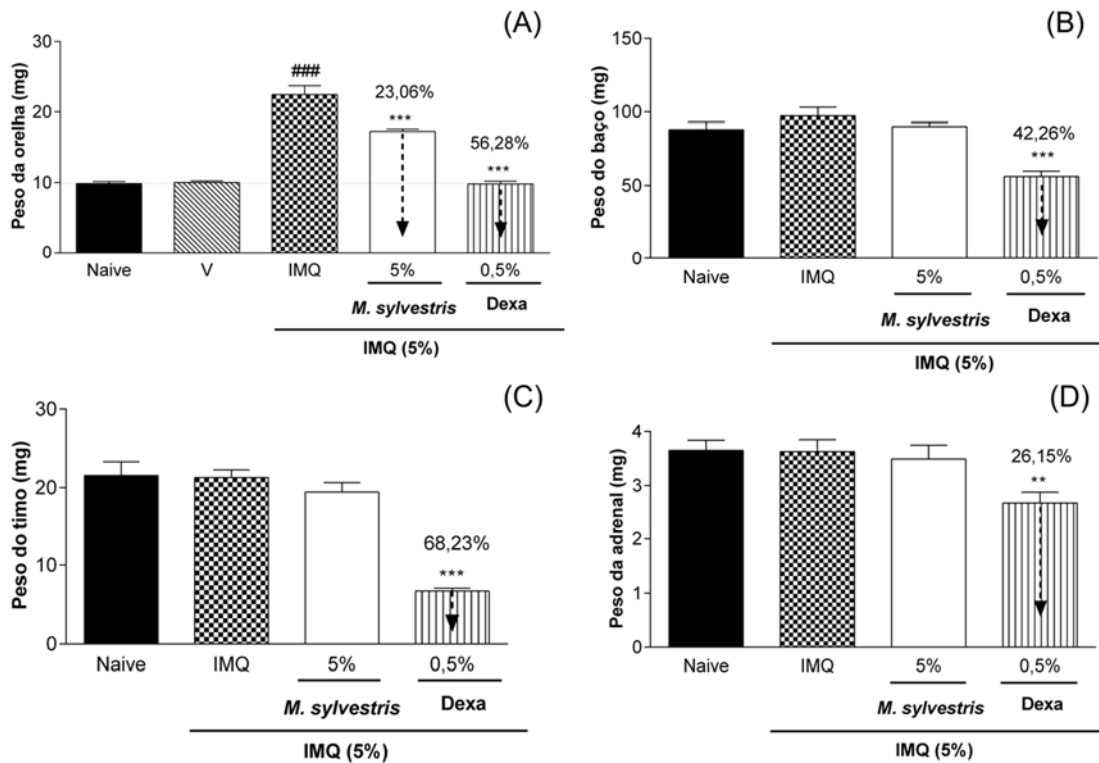


Figura 14. Efeito do EE da *M. sylvestris* sobre o peso de órgãos dos animais submetidos ao modelo de inflamação crônica induzido pela aplicação de IMQ. Tratamento com EE da *M. sylvestris* por via tópica (creme 5%) ou dexametasona (0,5%). (A) orelhas, (B) baço, (C) timo, (D) adrenal. Naive – animais que não receberam tratamento. Controle – animais induzidos com IMQ. A amostra foi coletada no último dia de experimento com aplicação múltipla do IMQ. Cada barra representa a média \pm E.P.M. (n=8). * para figura (A) significa diferença significativa quando comparada ao grupo IMQ; * para as figuras (B), (C) e (D) significa diferença significativa quando comparada ao grupo Naive; # para figura (A) significa diferença significativa quando comparada ao grupo Veículo; **P < 0,01, ***P < 0,001/ANOVA de uma via /Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Os corticoides são extensamente utilizados no tratamento de desordens inflamatórias da pele, sendo sua administração tópica efetiva no tratamento de processos inflamatórios crônicos, como a psoríase. Contudo, o uso prolongado destes fármacos pode levar ao aparecimento de diversos efeitos indesejados, como por exemplo, a atrofia da epiderme e derme, formação de estrias irreversíveis, hirsutismo,

acne e o atraso de respostas de reparo tecidual. Desta forma, o tratamento tópico com o extrato da *M. sylvestris* poderia ser uma alternativa no tratamento de processos inflamatórios da pele, o qual apresenta uma resposta significativa na supressão da resposta inflamatória, sem apresentar efeitos adversos de imunossupressão semelhantes aos observados com a utilização de glicocorticóides (SCHACKE *et al.*, 2002).

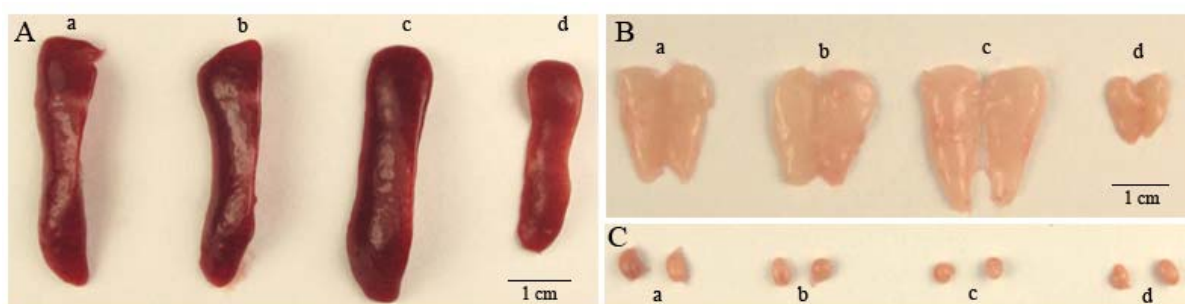


Figura 15. Imagens representativas dos órgãos dos animais submetidos ao modelo de inflamação crônica induzido pela aplicação de IMQ. (A) baço, (B) timo e (C) adrenal. a – Naive. b - Controle IMQ. c - Tratado com EE da *M. sylvestris* (creme 5%,tópica) ou d - Dexametasona (0,5%). A amostra foi coletada no último dia de experimento com aplicação múltipla.

5.3.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

5.3.2.1 Avaliação do EE da *M. sylvestris* sobre Viabilidade Celular

Quando realizados os ensaios de viabilidade celular nas três linhagens celulares (B16F10, 3T3 e HaCaT), através dos métodos de MTT e VN, em diferentes concentrações do EE da *M. sylvestris* (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 16), tem-se os seguintes resultados, para linhagem celular B16F10 (Fig. 16 A), foi verificado que, quando realizado o método do MTT, as concentrações de 30 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ reduziram a viabilidade celular ($62 \pm 22,6\%$ e $76 \pm 9,53\%$, respectivamente). Já para linhagem celular 3T3 (Fig. 16 C), também foi verificado que, quando realizado o mesmo método, nas mesmas concentrações também reduziram a viabilidade celular ($62 \pm 12,62\%$ e $77 \pm 10,46\%$, respectivamente). Contudo, para linhagem celular HaCaT (Fig. 16 E), foi verificada redução da viabilidade celular, pelo mesmo método nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($35 \pm 8,35\%$, $63 \pm 10,35\%$ e $83 \pm 6,88\%$, respectivamente).

Da mesma forma, quando realizado o ensaio do VN, apenas a linhagem HaCaT (Fig. 16 F), apresentou redução da viabilidade celular, nas concentrações de 10 µg/mL, 30 µg/mL e 100 µg/mL ($36 \pm 13,24\%$, $38 \pm 11,6\%$ e $44 \pm 17,11\%$, respectivamente).

Vale a pena comentar que as três linhagens celulares utilizadas neste estudo como um todo, no que diz respeito aos estudos *in vitro*, são as principais células que compõem a pele (ARNOLD *et al.*, 1994; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; FREINKEL e WOODLEY, 2001; HAAKE *et al.*, 2001; KANITAKIS, 2002; NESTLE; KAPLAN; *et al.*, 2009), e cada uma possui uma função importante tanto em processos inflamatórios (SPELLBERG, 2000; DEBENEDICTIS *et al.*, 2001; SABAT *et al.*, 2007), como em processos de pigmentação da pele (PENG *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015).

Os resultados de viabilidade celular verificados por Benso (2012) na linhagem 3T3, a qual não verificou redução da viabilidade celular nas concentrações de 0,01 µg/mL a 10 µg/mL, através do método do MTT, e os resultados verificados por Prudente (2013), na linhagem HaCaT, que demonstraram redução da viabilidade celular nas concentrações de 30 µg/mL e 100 µg/mL, através do método MTT e VN, corroboram com os resultados do presente estudo.

As concentrações de 0,03 µg/mL, 0,1 µg/mL, 0,3 µg/mL, 1 µg/mL e 3 µg/mL do EE da *M. sylvestris* de acordo com os ensaios realizados acima, seriam as concentrações que não teriam uma alteração significativa da viabilidade celular para as três linhagens celulares avaliadas, sugerindo serem mais seguras para futuros procedimentos *in vitro*. As concentrações de 10, 30 e 100 µg/mL do EE da *M. sylvestris* possuem toxicidade quando aplicadas diretamente nas células. Nessas concentrações foi relatado que o EE da malva causou morte celular por apoptose de células HaCaT, reduzindo a viabilidade em até $81,3 \pm 4,8 \%$ (100 µg/mL), através de marcação de Anexina V-PE (apoptose) e 7-AAD (necrose) em citometria de fluxo laminar (PRUDENTE, 2013).

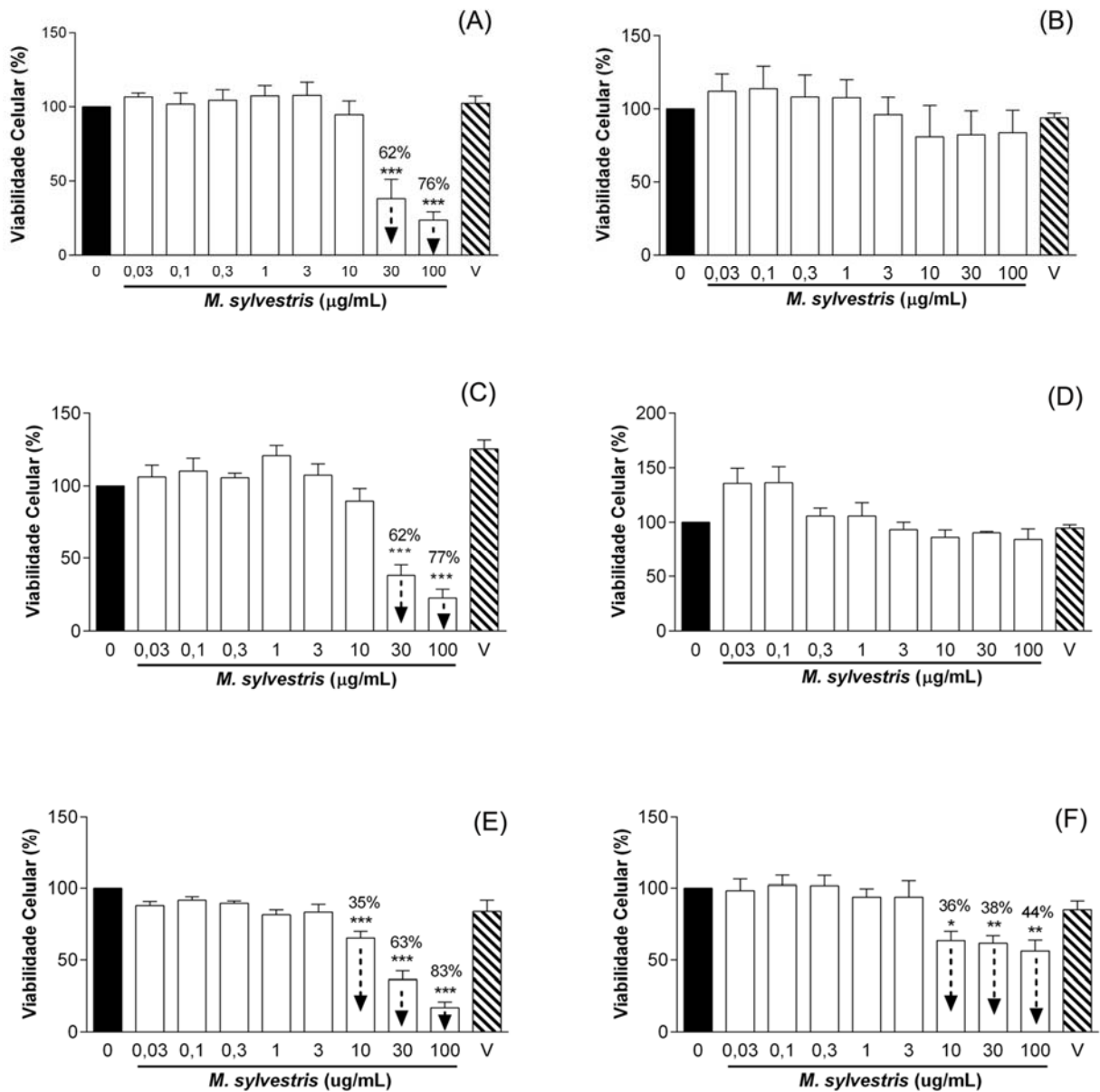


Figura 16. Avaliação da viabilidade celular em cultura de melanócitos (B16F10 - A e B), fibroblasto (3T3 - C e D) e queratinócitos (HaCaT- E e F) após a exposição (24 horas) a diferentes concentrações do EE da *M. sylvestris*. (A, C e E) Método de MTT e (B, D e F) Método de Vermelho neutro, V- Veículo (Etanol 1%). Proveniente de experimento em triplicata (n=3). * Diferença significativa quando comparada ao 0 (controle - células cultivadas apenas com meio de cultura); *P < 0,05 **P < 0,01, *P < 0,001/ANOVA de uma via /Newman-Keuls teste de múltipla comparação.**

As concentrações mais elevadas, que mostraram citotoxicidade, podem ser interessantes para explorar as possibilidades em tratamentos de doenças, relacionadas diretamente com a proliferação celular, nas quais indução de apoptose

seja importante, uma vez que o atual trabalho mostrou que ela também é citotóxica em células tumorais (melanoma humano - B16F10) (Fig. 16 A). Estes resultados também confirmam os dados de Daniela *et al.* (2007), que mostraram na mesma linhagem de melanoma e também em outra linhagem tumoral de melanoma humano (A375), a redução da proliferação celular pelo extrato metanólico da *M. sylvestris*.

5.3.3 Avaliação do potencial genotóxico

5.3.3.1 Revisão Sistemática

A revisão teve uma base de dados composta por 2289 artigos. Destes, 458 foram incluídos pelos critérios previamente estabelecidos. Um total de 24 ensaios para acessar a genotoxicidade de plantas medicinais foram identificados e avaliados, e verificou-se que 40% dos artigos utiliza mais que uma técnica (Fig. 17).

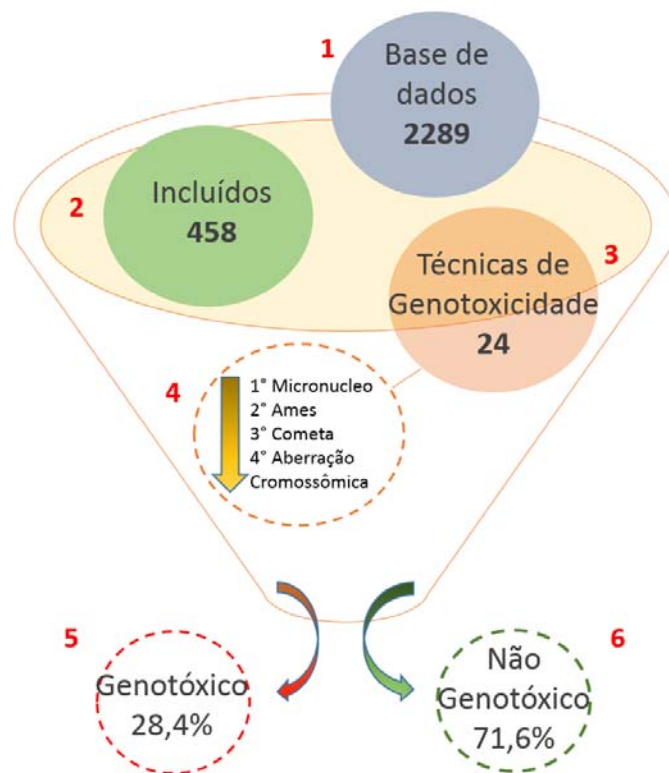


Figura 17. Apresentação resumida dos resultados da revisão sistemática em forma de gráfico. 1- Artigos encontrados pela busca nas bases de dados; 2 – Artigos selecionados e incluídos na revisão; 3 – Quantidade de técnicas utilizada pelos autores dos artigos incluídos; 4 – Ordem decrescente das quatro técnicas mais utilizadas, 5 – Percentagem de plantas medicinais que apresentaram genotoxicidade e 6 - Percentagem de plantas medicinais que não apresentaram genotoxicidade.

Os ensaios utilizados com mais frequência pelos autores para avaliar a genotoxicidade de plantas medicinais foram: Aberração Cromossômica (CA), Índice Mitótico (MI), *Allium cepa* (AC), *Salmonella/microsomal* (Ames), Reversão em *E. coli* WP2 (ERA), VITOTOX (VIT), Umu-C (UC), SOS *Inductest* (SOS), Segregação somática em *Aspergillus nidulans* (AN), Mutação em *Saccharomyces cerevisiae* (SC), Mutação somática e recombinação (SMART), Mutação recessiva do *Lethal X-linked* (SLRL) em *Drosophilla melanogaster*, *Ring-X-loss* (RXL), Anomalia da cauda do espermatozoide (SHA), Micronúcleo (MN), Cometa (SCGE), Indução da Apoptose (AI), *Locus of Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl-Transferase* (HGPRT) ou HPRT mutação de gene, Índice de Replicação (RI), *Unscheduled DNA Synthesis* (UDS), Troca de cromátides irmãs (SCE), Quebra do DNA plasmidial (PDB), *Mutações subsequentes* (FM) e Peptídeos citoplasmáticos indutores de mutações (ICPM) (Fig. 18). A maioria destes ensaios reportados em nossa revisão corrobora com os reportados por Ouedraogo *et al.* (2012), o qual se refere a métodos “omics” atuais e de avaliação da toxicidade (genotoxicidade, teratogenicidade e nefro toxicidade) de medicamentos à base de plantas e cogumelos (OUEDRAOGO *et al.*, 2012).

Os quatro ensaios mais frequentes foram o MN (172 vezes utilizado), Ames (171 vezes utilizado), Cometa (109 vezes utilizado) e Aberrações cromossômicas (77 vezes utilizado). A frequência de utilização destes ensaios pode ser reflexo da legislação específica (de desenvolvimento de uma nova droga ou medicamento, ou produto fitoterápico) existente para cada país de liberação de um novo produto para comercialização (FDA, 1997; EMA, 1998; EMEA, 2008; BRASIL, 2010a; CDSCO, 2010; ICH-S2(R1), 2011). Em nível mundial esforços têm sido feitos a fim de padronizar esses requisitos para liberação e novos fármacos, medicamentos, drogas ou produtos fitoterápicos para comercialização [ICH-S2(R1), 2011]. A maior frequência destes quatro ensaios pode também ser reflexo de que os mesmos constem no Guia da OECD de testes de genotoxicidade, oficialmente aprovados (OECD, 1997b; a; BENIGNI *et al.*, 2012; OECD, 2014a; e; b; d; c).

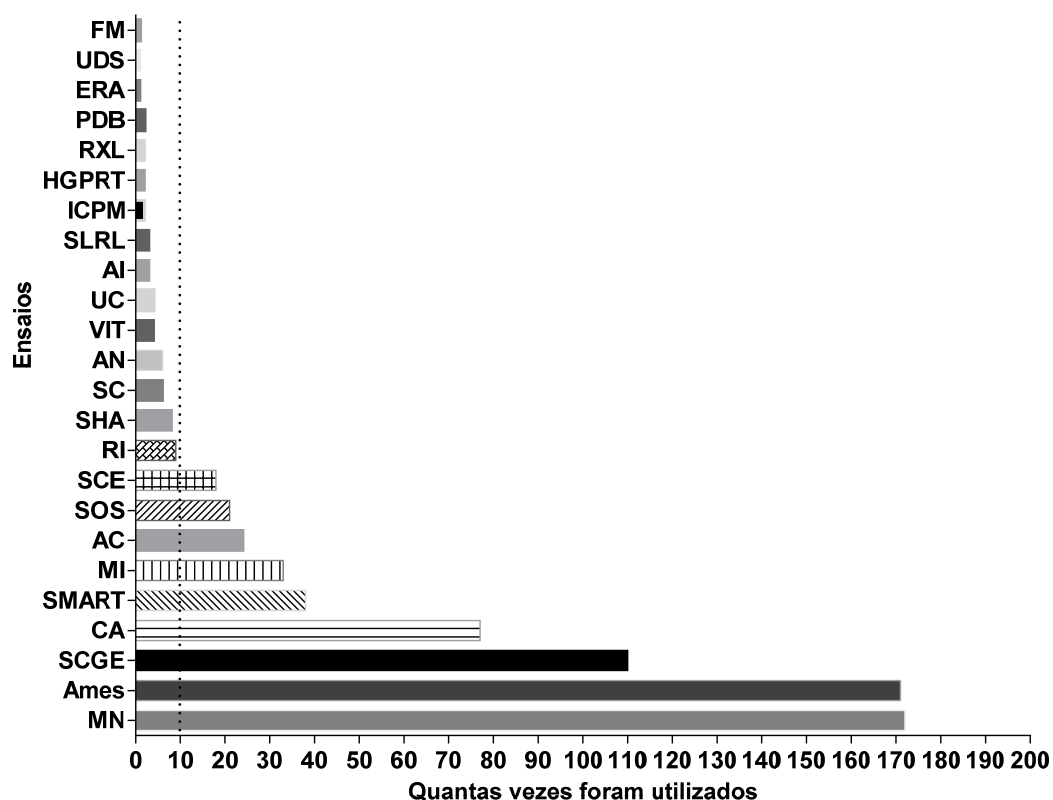


Figura 18. Frequência dos Ensaios/Técnicas de genotoxicidade mais utilizados pelos artigos incluídos na revisão. *Saccharomyces cerevisiae* (SC), Ring-X-loss test (RXL), *Aspergillus nidulans* (AN), Umu - C (UC), VITOTOX (VIT), HGPRT or HPRT gene mutation test (HGPRT), Somatic Mutations and Recombination Test (SMART), Sex-linked recessive lethal (SLRL), Unscheduled DNA Synthesis (UDS), Replication Indice (RI), Sister Chromatid Exchange (SCE), Sperm Head Anomaly (SHA), Induction of Cytoplasmic Petite Mutations (ICPM), *Allium cepa* (AC), Apoptose-Inducing (AI), Mitotic Index (MI), Chromosomal Aberration (CA), SOS chromotest/ inductest (SOS), *E. coli* WP2 Reversion Assay (ERA), Micronuclei (MN), Single-Stranded DNA Breaks (Comet - SCGE), Plasmid DNA breakage (PDB), Forward mutagenesis (FM), Bacterial reverse mutation assay (Ames).

Antes de utilizar um composto proveniente de uma planta medicinal como um agente terapêutico é de extrema importância ter acesso ao potencial genotóxico do mesmo, principalmente porque nesta revisão foi verificado que 28,4% (133 artigos) dos extratos analisados desde 2000 apresentaram atividade genotóxica, sendo que algumas destas plantas são utilizadas na medicina popular e outras utilizadas como planta medicinal inclusive com prescrição (VIZOSO PARRA *et al.*, 2000; WILLIMOTT *et al.*, 2007; VERSCHAEVE e VAN STADEN, 2008; WNUK *et al.*, 2009; SHIN *et al.*, 2011; TURKEZ e GEYIKOGLU, 2011; TÜRKEZ e TOĞAR, 2011; OUEDRAOGO *et al.*, 2012). Contudo, muitos destes estudos revelados nesta revisão não avaliam a

concentração real utilizada na medicina popular (infusões, xaropes entre outras), o que é preocupante quando se pretende extrapolar os resultados para o dia a dia de uma população, assim como a definição da técnica de avaliação e modelo experimental.

Os resultados obtidos nesta revisão sistemática de técnicas de genotoxicidade, junto com a bateria de testes exigidas pela ANVISA (BRASIL, 2010a) para desenvolvimento de medicamentos, justificam a importância dos ensaios utilizados para avaliar o potencial genotóxico do EE da *M. sylvestris*.

5.3.3.2 Avaliação do potencial genotóxico do EE da *M. sylvestris*

O Ensaio Cometa utilizado para avaliar o potencial genotóxico do extrato EE da *M. sylvestris*, foi realizado *in vitro* (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/mL) em três linhagens celulares: B16F10 (Fig. 19, A e B), 3T3 (Fig. 19, C) e HaCaT (Fig. 19, D); e *in vivo* (1 mg/orelha) em camundongos Swiss machos (Fig. 21, A e B). Todas as concentrações do extrato testadas tanto para o ensaio *in vitro*, como *in vivo*, não mostraram diferenças significativas quando comparados os resultados com o grupo controle negativo. Esses dados mostram que o EE da *M. sylvestris* nas concentrações testadas não possui atividade genotóxica, de dano no DNA em camundongos e nas três linhagens celulares testadas.

Também foi avaliado *in vitro* na linhagem celular de melanócitos (B16F10) a possível ação protetora e de reversão de danos ao DNA promovida pelo EE da *M. sylvestris* (0,3; 1; 3 µg/mL), contra a exposição ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 100 µM) (Fig. 20). Tanto quando as células foram expostas primeiramente ao H₂O₂ (por 2 horas), e, posteriormente, ao extrato (por mais 2 horas) (reversão), como quando as células foram expostas primeiramente ao extrato (por 2 horas) e, posteriormente, ao H₂O₂ (por mais 2 horas) (proteção), não foi verificada diferença significativa, tanto para proteção como reversão de danos ao DNA, das concentrações quando comparado com o grupo controle positivo. Assim, o extrato EE da *M. sylvestris* não desempenha um papel de proteções e/ou de correção de dano do DNA causado pela substância genotóxica (H₂O₂, 100 µM).

A classe de dano ao DNA que mais foi verificada para os grupos controle negativo e veículo *in vitro* e *in vivo* foi a Classe 2 (Tabela 4), para o grupo tratado com H₂O₂ (controle positivo da técnica *in vitro*) foi Classe 4 (Tabela 4), para o grupo tratado

com ciclofosfamida (controle positivo da técnica *in vivo*) foi Classe 2 (Tabela 4), conforme a metodologia utilizada (concentração da agarose e tempo de corrida).

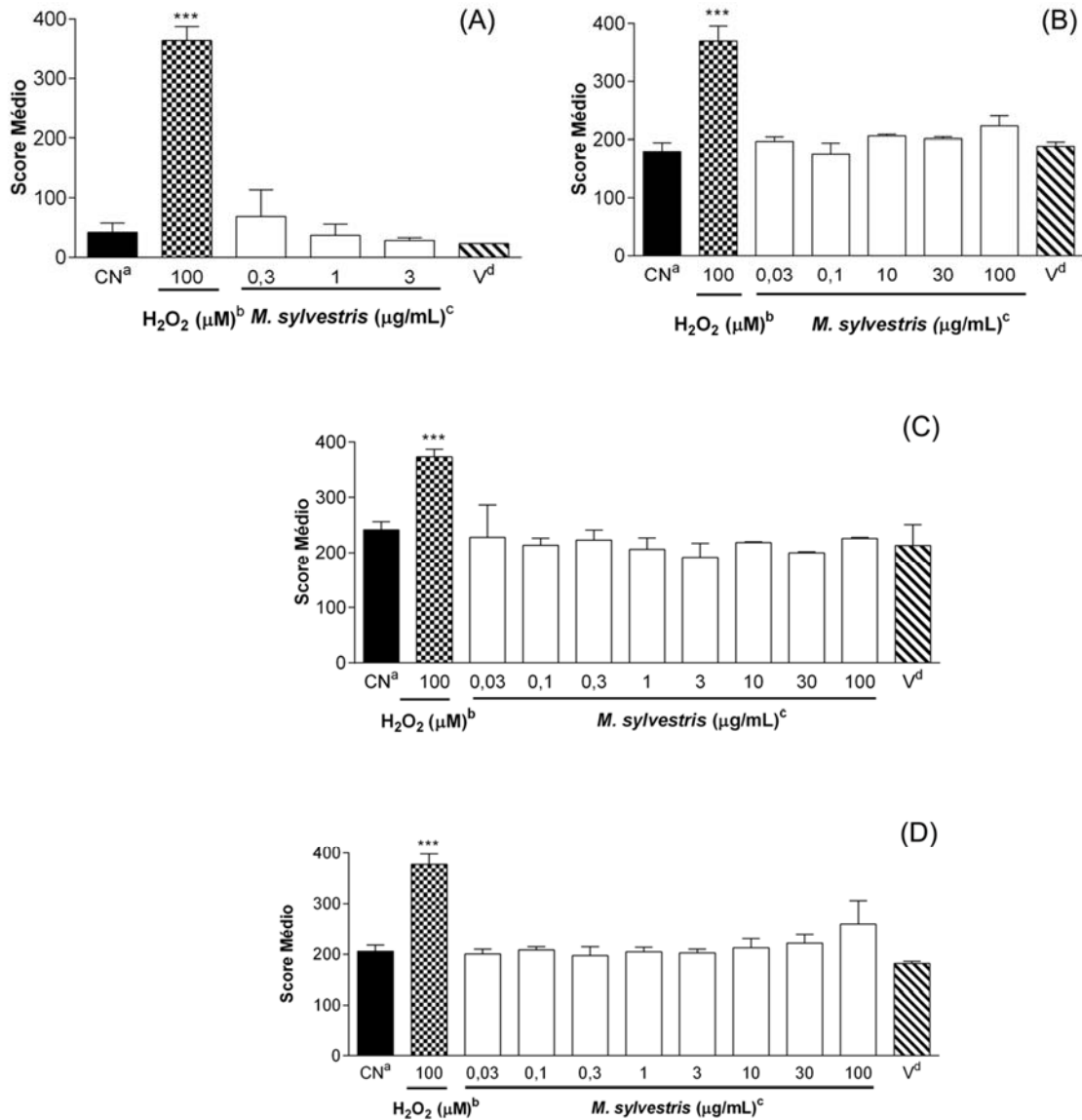


Figura 19. Escore médio do ensaio cometa em cultura de melanócitos (B16F10 – A e B), fibroblastos (3T3 - C) e queratinócito (HaCaT - D) após a exposição a diferentes concentrações do EE da *M. sylvestris*. Proveniente de experimento em triplicata (n=3). ^a Controle Negativo, ^b Controle Positivo, ^c Tratamento, e ^d Veículo (Etanol 1%); * Diferença significativa quando comparada ao CN; ***P < 0,001/ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

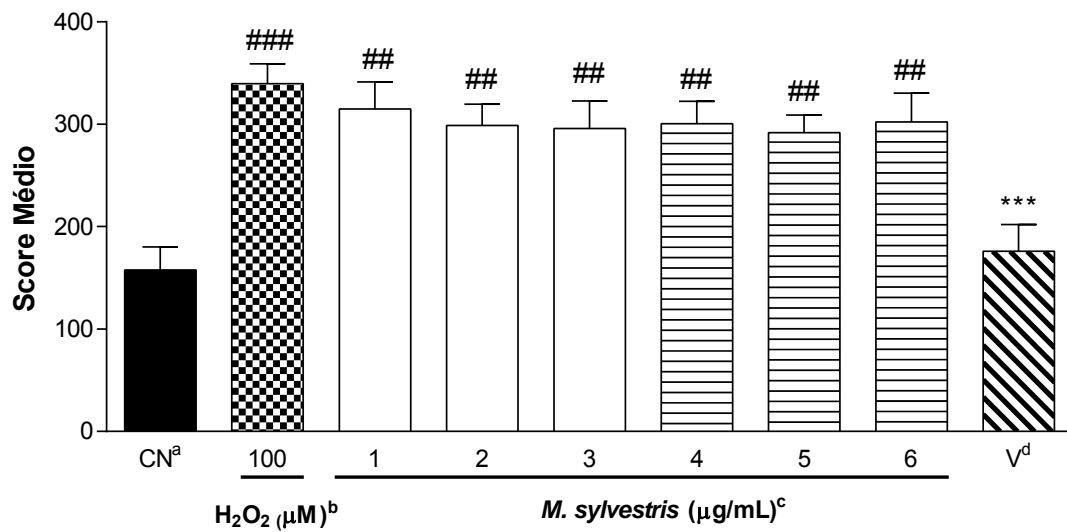


Figura 20. Escore médio do ensaio cometa em cultura de melanócitos (B16F10), após a exposição a diferentes concentrações do EE da *M. sylvestris*. Proveniente de experimento em triplicata (n=3). ^a Controle Negativo, ^b Controle Positivo, ^c Tratamento, e ^d Veículo (Etanol 0,02%); 1- 0,3 μg/mL (2h de exposição) + H₂O₂ (100 μM), 2 – 1 μg/mL + H₂O₂ (100 μM), 3- 3 μg/mL + H₂O₂ (100 μM), 4 - H₂O₂ (100 μM) + 0,3 μg/mL, 5 - H₂O₂ (100 μM) + 1 μg/mL, e 6 - H₂O₂ (100 μM) + 3 μg/mL. # Diferença significativa quando comparada ao CN, * quando comparado ao CP. ###/***P < 0,001, ##P < 0,01/ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

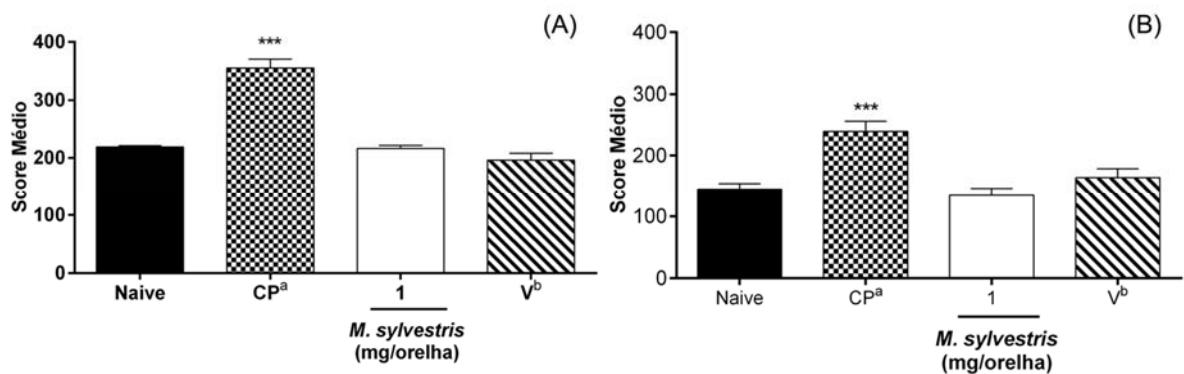
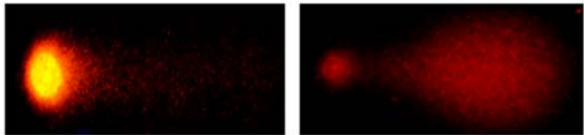


Figura 21. Escore médio do ensaio cometa em camundongos após a aplicação do EE da *M. sylvestris* (1 mg/orelha, 2 vezes/dia, 7 dias). A- Medula óssea e B- Sangue Periférico; ^a Controle Positivo (CP – Ciclofosfamida, (50 mg/kg, i.p., 24 h antes da eutanásia), e ^b Veículo (V, acetona). A amostra foi coletada no último dia de experimento. * Diferença significativa quando comparada ao Naive; ***P < 0.001/ANOVA de uma via /Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Tabela 4 – Distribuição da incidência de Classe de dano no DNA mais representativa, verificada no ensaio Cometa, *in vitro* e *in vivo* para cada grupo analisado.

		Classe de dano ao DNA		
		Classe 2	Classe 4	
				
Ensaio <i>In vitro</i>	Grupo	Melanócito (B16F10)		
		Controle Negativo	+	
		Veículo	+	
		H ₂ O ₂ (100 µM)		+
	EEMS (0,03 a 100 µg/mL)	+		
	Grupo	Melanócito (B16F10) P e R		
		Controle Negativo	+	
		Veículo	+	
		H ₂ O ₂ (100 µM)		+
	EEMS 1, 2, 3, 4, 5 e 6		+	
	Grupo	Fibroblasto (3T3)		
		Controle Negativo	+	
		Veículo	+	
		H ₂ O ₂ (100 µM)		+
	EEMS (0,03 a 100 µg/mL)	+		
	Grupo	Queratinócito (HaCat)		
Controle Negativo		+		
Veículo		+		
H ₂ O ₂ (100 µM)			+	
EEMS (0,03 a 100 µg/mL)	+			
Ensaio <i>In vivo</i>	Grupo	SP e MO		
		Controle Negativo	+	
		Veículo	+	
		Ciclofosfamida (50 mg/kg, ip.)	+	
EEMS (1mg/orelha)	+			

P – proteção; R – reversão.

O Ensaio MN utilizado também para avaliar o potencial genotóxico do extrato EE da *M. sylvestris*, foi realizado *in vivo*, utilizando a dose do extrato de 1 mg/orelha, com sangue periférico de camundongos Swiss (machos) (Fig. 22), e a concentração do extrato testada não mostrou diferenças significativas na frequência de Eritrócitos Nomocromáticos Micronucleados (NCEMN) (Fig.23), quando comparados os resultados com o grupo controle negativo. Assim, pode-se concluir que o EE da *M. sylvestris* nas concentrações testadas não possui atividade genotóxica (aneugênica e/ou clastogênica) de dano no DNA em camundongos Swiss.

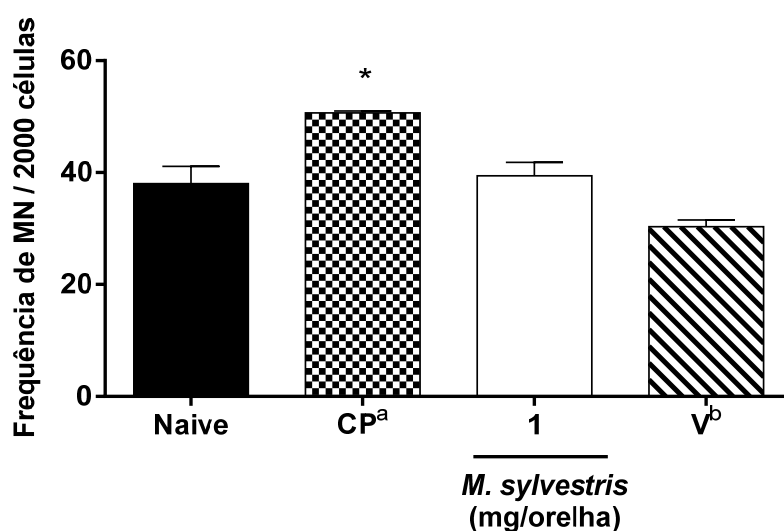


Figura 22. Frequência de MN em células sanguíneas de camundongos Swiss após a aplicação do EE da *M. sylvestris* (1 mg/orelha, 2 vezes/dia, 7 dias). ^a Controle Positivo (CP – Ciclofosfamida (50 mg/Kg, intraperitoneal (i.p.), 24h antes da eutanásia), e ^b Veículo (V, acetona). A amostra foi coletada no último dia de experimento. * Diferença significativa quando comparada ao Naive; **P < 0,01/ANOVA de uma via/Newman-Keuls teste de múltipla comparação.

Até o momento, apenas um trabalho apresentou dados sobre a atividade genotóxica do EE *M. sylvestris*, o qual em um modelo semelhante, não verificou atividade genotóxica em cultura de fibroblastos (3T3), nas concentrações testadas de 0,3 a 3 µg/mL do extrato (BENSO, 2012), corroborando com os resultados encontrados neste estudo para esta linhagem celular. Porém os resultados deste estudo ainda completam os de Benso (2012), quanto a concentrações testadas, que foram de 0,03 a 100 µg/mL, e expande os testes para outras linhagens celulares cutâneas, como: B16F10 e HaCaT; assim como ensaios de proteção/recuperação de

dano no DNA em na linhagem celular, B16F10 e, como estudos *in vivo* (ensaio Cometa e MN), colaborando ainda mais com dados de segurança do EE da *M. sylvestris*.

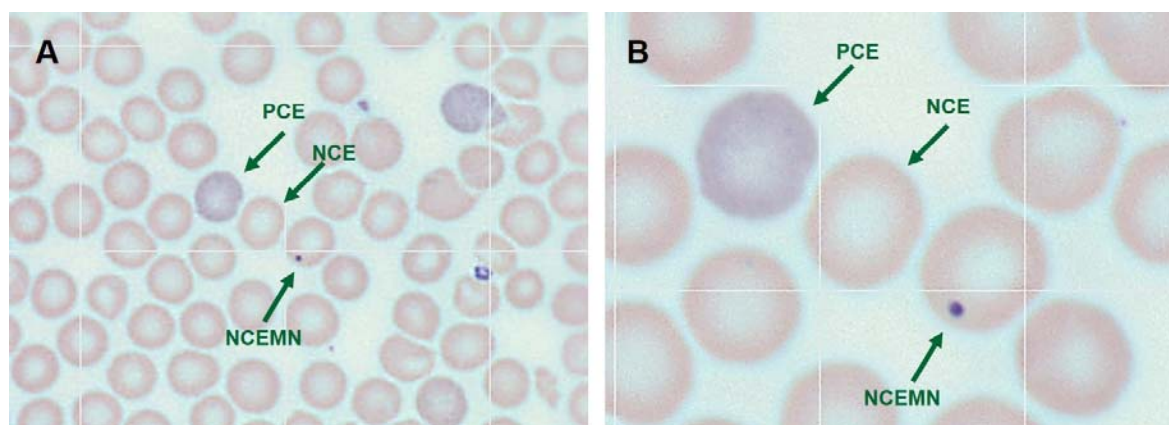


Figura 23. Imagem representativa de eritrócitos de sangue periférico avaliados. PCE – Eritrócitos Policromático; NCE – Eritrócito Normocromático; NCEMN - Eritrócito Normocromático com MN. A – Zoom 40% e Magnificação de 40X; B - Zoom 100% e Magnificação de 100X.

Estudos recentes demonstraram que dois dos principais compostos encontrados no EE da *M. Sylvestris*, quercetina e malvidina não são genotóxicos e têm um potencial protetivo para dano no DNA. A quercetina, quando adicionada a dieta de camundongos (C57BL/6JOlaHsd, 300mg/kg por 12 semanas), não aumentou expressão de genes relacionados com dano no DNA, no fígado e no intestino delgado destes animais (HOEK-VAN DEN HIL *et al.*, 2015); e, mostrou ter um efeito protetor em linfócitos humanos expostos a uma micotoxina (*Ochratoxin A*), (PERIASAMY *et al.*, 2014). De forma semelhante, alguns autores sugerem que a quercetina também pode ser muito promissora com ação quimioprotetiva após sessões de quimioterapia, por alterar a expressão de genes em resposta a agentes exógenos genotóxicos e ao estresse oxidativos em células normais (CZEPAS e GWOZDZINSKI, 2014), assim como o que foi verificado em células saudáveis sanguíneas, de fígado e rim de camundongos (Swiss), tratados primeiramente com quercetina (50 mg/kg) e após expostos a cisplatina (utilizada na quimioterapia Hipertermal Intraperitoneal) (ORSOLIC e CAR, 2014). A malvidina, outro composto encontrado no EE da *M. sylvestris*, também mostrou efeito protetor a danos no DNA em medula óssea de camundongos (Swiss), nas doses de 0,25 e 0,5 mg/kg, contra a exposição à ciclofosfamida (50 mg/Kg) (KHANDELWAL e ABRAHAM, 2014).

Os resultados obtidos neste estudo, em conjunto com os resultados encontrados na literatura, fazem com que seja possível concluir que a *M. sylvestris* é uma planta segura para utilização, quando se diz respeito à atividade genotóxica, tanto *in vitro* como *in vivo*, por via sistêmica e tópica, podendo até conferir proteção ao DNA perante a exposição a um agente físico, químico ou biológico com potencial genotóxico. As técnicas utilizadas reforçam a confiabilidade dos resultados obtidos, uma vez que, o ensaio do MN é considerado altamente seguro, rápido e capaz de determinar um grande espectro de danos no DNA, especialmente no nível cromossômico podendo avaliar a ação mutagênica (OECD, 1997b; HOVHANNISYAN, 2010). O ensaio Cometa, é reconhecido como um ensaio de genotoxicidade alternativo *in vivo* junto com o ensaio do MN (ICH, 2012), junto às agências que regulamentam o desenvolvimento de uma nova droga ou medicamento, com vantagens, como resultado rápido com alta sensibilidade (HOVHANNISYAN, 2010; KANG *et al.*, 2013), relativamente simples e de baixo custo (BELPAEME *et al.*, 1998), quantitativo quando necessário, apresentando resultados obtidos de uma única célula em amostras tanto *in vivo* como *in vitro* (SINGH *et al.*, 1988; HOVHANNISYAN, 2010; KANG *et al.*, 2013). Estudos recentes apresentados no *Workshop do European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animal Testing (EURL ECVAM)*, reforçam a importância de um ensaio *in vivo* com mamíferos quando se obtém um resultado positivo para o ensaio Ames, já que um resultado positivo-Ames nem sempre é positivo em ensaios *in vivo* com mamíferos (KIRKLAND *et al.*, 2014).

As áreas de aplicação destas técnicas estão crescendo exponencialmente, e cada vez mais são incluídas com outras técnicas para avaliar o efeito genotóxico de muitos agentes ou xenobióticos em células somáticas e germinativas (HARTMANN e SPEIT, 1997), na evolução do reparo do DNA (LAFFON *et al.*, 2002), em aplicações clínicas (SARDAS *et al.*, 1998; FRENZILLI *et al.*, 2000; KASSIE *et al.*, 2000; KAN *et al.*, 2002; FRENZILLI *et al.*, 2009); e de biomonitoramento (KASSIE *et al.*, 2001; MONARCA *et al.*, 2001).

Ainda que existam relatos da utilização da malva desde 3000 AC, e que no Brasil a ANVISA tenha regulamentado a utilização de certas plantas medicinais, como droga vegetal, incluindo a malva (BRASIL, 2010b), a necessidade de estudos, em especial os de Fase I e II, são de extrema importância para dar suporte científico de cunho clínico (BRASIL, 2002; 2010c), que comprove a real eficácia e segurança da

M. sylvestris, entre outras plantas propostas para utilização. Os estudos clínicos com a *M. Sylvestris*, até o momento, são baseados em avaliação visual da recuperação cutânea ou relato dos pacientes da redução do sintoma abdominal (BEHROOZ BARIKBIN *et al.*, 2010; ELSAGH *et al.*, 2015), contudo nenhum estudo justifica a escolha das doses utilizadas, comparando com estudos pré-clínicos já realizados. Por estes motivos, estudos clínicos que apresentem outros parâmetros como, histológicos, bioquímicos, ou mesmo moleculares são necessários para obter-se resultados que comprovem a eficácia e segurança do tratamento proposto.

Tendo em vista a legislação necessária para propor um novo produto fitoterápico ou mesmo um medicamento a base de extrato ou composto de planta medicinal (BRASIL, 2010a; ICH-S2(R1), 2011; ICH, 2012; BRASIL, 2014), quando se diz respeito aos estudos de toxicidade de dose única, repetida, genotoxicidade, tolerância local (sistêmica, dérmica), os dados pré-clínicos fornecidos por este estudo unindo com os encontrados na literatura, fornecem base para estudos clínicos tópicos com a *M. sylvestris*. O infográfico abaixo resume os resultados de eficácia e segurança do EE da *M. sylvestris* estudados (Fig. 24).

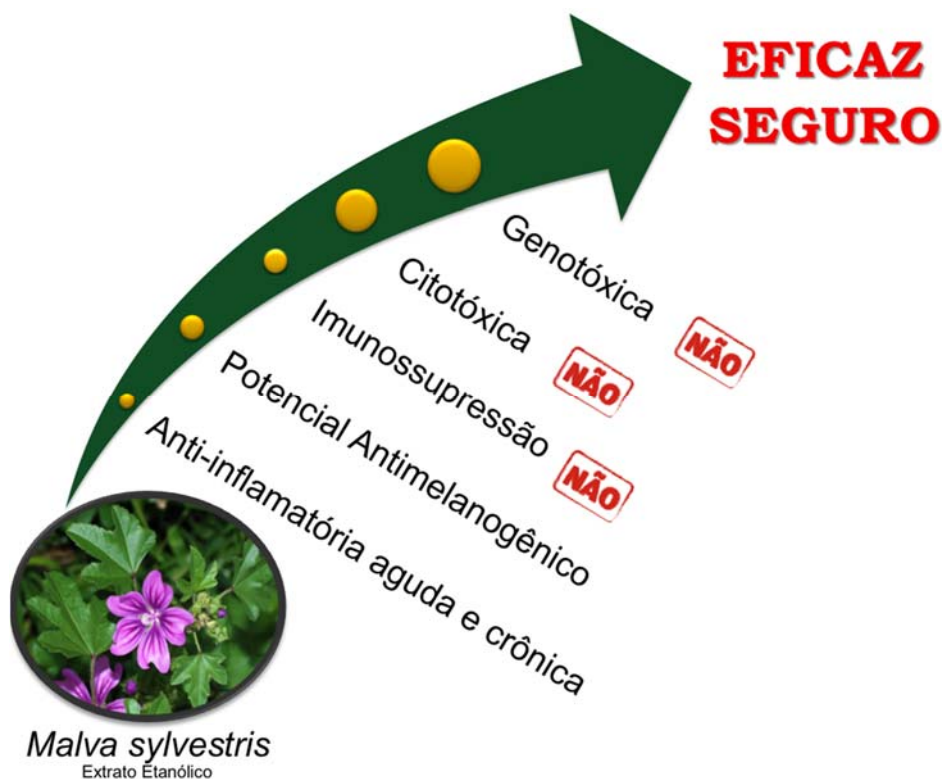


Figura 24 – Conclusões preliminares dos estudos do EE *M. sylvestris* que levam a uma eficácia e segurança do extrato estudado.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo mostraram que:

- a. O EE da *M. sylvestris* foi capaz de reduzir a formação de edema mediada por TPA, tanto quando administrado por via tópica como por via oral, demonstrando apresentar atividade anti-inflamatória por ambas as vias;
- b. A administração oral do EE da *M. sylvestris* também apresentou atividade anti-edematogênica em modelo de inflamação aguda com perfil infeccioso;
- c. A aplicação tópica do EE da *M. sylvestris* em diferentes formulações farmacêuticas, creme e gel, mantiveram o perfil anti-inflamatório do extrato;
- d. O EE da *M. sylvestris* foi capaz de reverter a formação de edema induzido pela aplicação de IMQ, mostrando também apresentar atividade anti-inflamatória em modelo de inflamação crônica;
- e. O EE da *M. sylvestris* mostrou-se eficaz na redução dos níveis de melanina, assim como, da atividade enzimática da tirosinase *in vitro*;
- f. A utilização prolongada do EE da *M. sylvestris* não promoveu efeitos adversos relacionados à imunossupressão;
- g. A utilização do EE da *M. sylvestris in vitro* mostrou-se segura através de ensaios de citotoxicidade em diferentes linhagens celulares;
- h. A utilização do EE da *M. sylvestris in vitro* mostrou-se segura através de ensaios genotóxico em modelos *in vitro* e *in vivo*;

O EE da *M. sylvestris* foi eficaz e seguro tanto para tratamento de afecções inflamatórias e distúrbios de pigmentação da pele, *in vivo* e *in vitro*, em diferentes modelos, por diferentes vias de administração e formas farmacêuticas. Contudo, vale a pena comentar, que este sendo o primeiro trabalho a relatar um potencial despigmentante da *M. sylvestris*, e com as evidências encontradas, abre-se um gama de possíveis estudos futuros sobre esta atividade. Por outro lado, a atividade anti-inflamatória tópica pré-clínica está bem estabelecida e sustentada, levando a acreditar que modelos clínicos que comprovem esta atividade são necessários, bem como a sua segurança. Este estudo também reforça as conclusões obtidas por outros autores, consequentemente, evidenciando o seu uso etnofarmacológico.

7 REFERÊNCIAS

ADALATKHAH, H.; SADEGHI BAZARGANI, H. The association between melasma and postinflammatory hyperpigmentation in acne patients. **Iran Red Crescent Med J**, v.15, n.5, May, p.400-3. 2013.

AFIFI, T.; DE GANNES, G.; HUANG, C.; ZHOU, Y. Topical therapies for psoriasis: evidence-based review. **Can Fam Physician**, v.51, Apr, p.519-25. 2005.

AHLUWALIA, A. Topical glucocorticoids and the skin--mechanisms of action: an update. **Mediators Inflamm**, v.7, n.3, p.183-93. 1998.

AHN, K. S.; MOON, K. Y.; LEE, J.; KIM, Y. S. Downregulation of NF-kappaB activation in human keratinocytes by melanogenic inhibitors. **J Dermatol Sci**, v.31, n.3, May, p.193-201. 2003.

AHN, S. K.; BAK, H. N.; PARK, B. D.; KIM, Y. H.; YOUM, J. K.; CHOI, E. H.; HONG, S. P.; LEE, S. H. Effects of a multilamellar emulsion on glucocorticoid-induced epidermal atrophy and barrier impairment. **J Dermatol**, v.33, n.2, Feb, p.80-90. 2006.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines.. **Herbal Gram**, v.28, p.13-9. 1993.

ALBANESI, C.; DE PITA, O.; GIROLOMONI, G. Resident skin cells in psoriasis: a special look at the pathogenetic functions of keratinocytes. **Clin Dermatol**, v.25, n.6, Nov-Dec, p.581-8. 2007.

ALVES, P. M.; QUEIROZ, L. M. G.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. D. S. V. In vitro antimicrobial, antiadherent and antifungal activity of Brazilian medicinal plants on oral biofilm microorganisms and strains of the genus *Candida*. **Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica in vitro de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida***, v.42, n.2, p.222-224. 2009.

AMERICAN ACADEMY OF ALLERGY, A.; IMMUNOLOGY; AMERICAN COLLEGE OF ALLERGY, A.; IMMUNOLOGY. Contact dermatitis: a practice parameter. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v.97, n.3 Suppl 2, Sep, p.S1-38. 2006.

ARATANI, Y.; KOYAMA, H.; NYUI, S.; SUZUKI, K.; KURA, F.; MAEDA, N. Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. **Infect Immun**, v.67, n.4, Apr, p.1828-36. 1999.

ARNOLD, H. L.; ODOM, R. B.; JAMES, W. D. A pele: estrutura básica e função. (1994). In. **Doenças da Pele de Andrews: Dermatologia Clínica** Manole: 1-14.

ARRUDA, L.; YPIRANGA, S.; MARTINS, G. A. Tratamento sistêmico da psoríase - Parte II: Imunomoduladores biológicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, p.393-408. 2004.

ARUNG, E. T.; FURUTA, S.; ISHIKAWA, H.; KUSUMA, I. K.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. Anti-melanogenesis properties of quercetin- and its derivative-rich extract from *Allium cepa*. **Food Chemistry** v.124, p.1024-28. 2011.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. Discromias. (1999). In. **Dermatologia**Guanabara-Koogan: 54-62.

AZULAY, R. D.; AZULAY, D. R. A Pele: Embriologia, estrutura e Fisiologia. (1999). In. **Dermatologia**. Guanabara-Koogan: 2-14.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol**, v.162, p.327-34. 1988.

BALLERO, M.; POLI, F.; SACCHETTI, G.; LOI, M. C. Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore (south-western Sardinia). **Fitoterapia**, v.72, n.7, Nov, p.788-801. 2001.

BARROS, L.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. **Food Chem Toxicol**, v.48, n.6, Jun, p.1466-72. 2010.

BARROS, L.; DUEÑAS, M.; CARVALHO, A. M.; FERREIRA, I. C. F. R.; SANTOS-BUELGA, C. Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n.5, p.1576-1582. 2012.

BAS, E.; RECIO, M. C.; MANEZ, S.; GINER, R. M.; ESCANDELL, J. M.; LOPEZ-GINES, C.; RIOS, J. L. New insight into the inhibition of the inflammatory response to experimental delayed-type hypersensitivity reactions in mice by scopolioside A. **Eur J Pharmacol**, v.555, n.2-3, Jan 26, p.199-210. 2007.

BASAVARAJ, K. H.; NAVYA, M. A.; RASHMI, R. Stress and quality of life in psoriasis: an update. **Int J Dermatol**, v.50, n.7, Jul, p.783-92. 2011.

BAUER, A. Contact dermatitis in the cleaning industry. **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, v.13, n.5, Oct, p.521-4. 2013.

BEHROOZ BARIKBIN; MAAREFAT, A.; RAHGOSHAI, R.; MORAVVEJ, H.; MOHTASHAM, N.; YOUSEFI, M. Malva Sylvestris in the treatment of hand eczema. **Iran J Dermatol**, v.13, p.131-4. 2010.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of thw *in vivo* alkaline cometa assay for detecting genomic damage in marine flatfish. **Mutat. Res.**, v.415, p.167-84. 1998.

BENIGNI, R.; BOSSA, C.; TCHEREMENSKAIA, O.; BATTISTELLI, C. L.; CRETTAZ, P. The new ISSMIC database on *in vivo* micronucleus and its role in assessing genotoxicity testing strategies. **Mutagenesis**, v.27, n.1, Jan, p.87-92. 2012.

BENSO, B. **Estudo do efeito da *Malva sylvestris* em fibroblastos estimulados por LPS**. (Monografia). Clínica Integrada, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

BILLETER, M.; MEIER, B.; STICHER, O. 8-Hydroxyflavonoid Glucuronides from *Malva-Sylvestris*. **Phytochem Anal**, v.30, n.3, p.987-90. 1991.

BIRIMI, T. **SANAEM**. 2007. Disponível em: <http://www.taek.gov.tr/sanaem/html/tip_birimi.html>. Acesso em: 18 nov.

BLUMENBERG, M.; TOMIC-CANIC, M. Human epidermal keratinocyte: keratinization processes. **Exs**, v.78, p.1-29. 1997.

BOLLER, S.; SOLDI, C.; MARQUES, M. C.; SANTOS, E. P.; CABRINI, D. A.; PIZZOLATTI, M. G.; ZAMPONIO, A. R.; OTUKI, M. F. Anti-inflammatory effect of crude extract and isolated compounds from *Baccharis illinita* DC in acute skin inflammation. **J Ethnopharmacol**, v.130, n.2, Jul 20, p.262-6. 2010.

BONE, R. C. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. **Clin Microbiol Rev**, v.6, n.1, Jan, p.57-68. 1993.

BONJAR, S. Evaluation of antibacterial properties of some medicinal plants used in Iran. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, n.2-3, p.301-305. 2004.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett**, v.24, n.2-3, Feb-Mar, p.119-24. 1985.

BOUHLEL, I.; KILANI, S.; SKANDRANI, I.; AMAR, R. B.; NEFATTI, A.; LAPORTE, F.; HININGER-FAVIER, I.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. *Acacia salicina* extracts protect against DNA damage and mutagenesis in bacteria and human lymphoblast cell K562 cultures. **Nutrition Research**, v.28, n.3, p.190-197. 2008.

BOUHLEL, I.; VALENTI, K.; KILANI, S.; SKANDRANI, I.; BEN SGHAIER, M.; MARIOTTE, A.-M.; DIJOUX-FRANCA, M.-G.; GHEDIRA, K.; HININGER-FAVIER, I.; LAPORTE, F.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Antimutagenic, antigenotoxic and antioxidant activities of *Acacia salicina* extracts (ASE) and modulation of cell gene expression by H₂O₂ and ASE treatment. **Toxicology in Vitro**, v.22, n.5, p.1264-1272. 2008.

BRASIL. **Pesquisa Clínica**. 2002. ANVISA, Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/pesquisa/def.htm>>. Acesso em: 20 de julho

_____. **Guia para a Condução de Estudos não Clínicos de Segurança Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos** 2010a. Agência de Vigilância

Sanitária (ANVISA), Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso em:

_____. **Resolução RDC n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à ANVISA e dá outras providências.**: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n.10/ 2010b.

_____. **Resolução RDC n° 55, de 16 de dezembro de 2010. Dispõe sobre o registro de produtos biológicos novos e produtos biológicos e dá outras providências:** ANVISA. RDC n° 55/ 2010c.

_____. **Resolução RDC n. 26 de 13 de maio de 2014. Guia de orientação para registro de medicamento fitoterápico e/ou produto tradicional fitoterápico:** Agencia de Vigilância Sanitária. RDC n° 26/ 2014.

BRIGANTI, S.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigment Cell Res**, v.16, n.2, Apr, p.101-10. 2003.

BULUT, G.; TUZLACI, E. Folk medicinal plants of Bayramiç (Çanakkale-Turkey). **Journal of Pharmacy of Istanbul University**, v.40, n.1, p.87-99. 2008.

BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; I.G., C. Evaluation of Health Aspects of Kojic Acid in Food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.33, p.80-01. 2001.

BUTLER, L.; MOWAD, C. Allergic contact dermatitis in dermatologic surgery: review of common allergens. **Dermatitis**, v.24, n.5, Sep-Oct, p.215-21. 2013.

CAI, Y.; SHEN, X.; DING, C.; QI, C.; LI, K.; LI, X.; JALA, V. R.; ZHANG, H. G.; WANG, T.; ZHENG, J.; YAN, J. Pivotal role of dermal IL-17-producing gammadelta T cells in skin inflammation. **Immunity**, v.35, n.4, Oct 28, p.596-610. 2011.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v.33, n.2, Feb, p.179-89. 2000.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-Inflammatory Compounds of Plant Origin. Part II. Modulation of Pro-Inflammatory Cytokines, Chemokines and Adhesion Molecules. **Planta Med**, v.70, n.02, 02.03.2004, p.93,103. 2004.

CAYCE, K. A.; MCMICHAEL, A. J.; FELDMAN, S. R. Hyperpigmentation: an overview of the common afflictions. **Dermatol Nurs**, v.16, n.5, Oct, p.401-6, 413-6; quiz 417. 2004.

CDSCO. **Common Technical Document (CTD) - Guidance for Industry on Preparation of Common Technical Document for import / manufacture and Marketing Approval of New Drugs for human use (New Drug Application - NDA).** New Delhi: IPA - Indian Pharmaceutical Association 2010.

CHAU, C. F.; WU, S. H. The development of regulation of Chinese herbal medicines for both medicinal and food uses. **Trends Food SciTech**, v.17, p.313-23. 2006.

CHEN, L. F.; GREENE, W. C. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.5, n.5, May, p.392-401. 2004.

CHICLANA, C. F.; ENRIQUE A.; E., C. A. Topical antiinflammatory activity of *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) on carragenin-induced edema in rats. **Lat Am J Pharm**, v.28, n.2, p.275-78. 2009.

CHO, S. B.; KIM, J. S.; KIM, M. J. Melasma treatment in Korean women using a 1064-nm Q-switched Nd:YAG laser with low pulse energy. **Clin Exp Dermatol**, v.34, n.8, Dec, p.e847-50. 2009.

CHOUNG, M. G.; HWANG, Y. S.; KIM, G. P.; AHN, K. G.; SHIM, H. S.; HONG, S. B.; CHOI, J. H.; YU, C. Y.; CHUNG, I. M.; KIM, S. H.; LIM, J. D. Antimelanogenic Effect and Whitening of Anthocyanin Rich Fraction from Seeds of *Liriope platyphylla*. **Korean journal of medicinal crop science**, v.21, n.5, p.361-371. 2013.

CHUN, K. S.; KUNDU, J. K.; PARK, K. K.; CHUNG, W. Y.; SURH, Y. J. Inhibition of phorbol ester-induced mouse skin tumor promotion and COX-2 expression by celecoxib: C/EBP as a potential molecular target. **Cancer Res Treat**, v.38, n.3, p.152-8. 2006.

CLASSEN, B.; BLASCHEK, W. An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*. **Planta Med**, v.68, n.3, Mar, p.232-6. 2002.

COGO, L. L.; MONTEIRO, C. L.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; CUNICO, M. M.; RIBEIRO, M. L.; DE CAMARGO, E. R.; KUSSEN, G. M.; NOGUEIRA KDA, S.; COSTA, L. M. Anti-Helicobacter pylori activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. **Braz J Microbiol**, v.41, n.2, Apr, p.304-9. 2010.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. **Mol Biotechnol**, v.26, n.3, Mar, p.249-61. 2004.

COLUCCI, R.; LOTTI, T.; MORETTI, S. Vitiligo: an update on current pharmacotherapy and future directions. **Expert Opin Pharmacother**, v.13, n.13, Sep, p.1885-99. 2012.

COMMO, S.; GAILLARD, O.; THIBAUT, S.; BERNARD, B. A. Absence of TRP-2 in melanogenic melanocytes of human hair. **Pigment Cell Res**, v.17, n.5, Oct, p.488-97. 2004.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; LOGGIA, R. D. In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **J Ethnopharmacol**, v.116, n.1, Feb 28, p.144-51. 2008.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A.; MENICHINI, F.; LOGGIA, R. D. *In vivo* anti-inflammatory and in vitro

antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **J Ethnopharmacol**, v.116, n.1, Feb 28, p.144-51. 2008.

CORNARA, L.; LA ROCCA, A.; MARSILI, S.; MARIOTTI, M. G. Traditional uses of plants in the *Eastern Riviera* (Liguria, Italy). **J Ethnopharmacol**, v.125, n.1, Aug 17, p.16-30. 2009.

COSTA, A. F. **Farmacognosia** Lisboa: Fundação Caloust Gulbekian Manuais Universitários, v.2. 2002

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **FASEB J**, v.21, n.4, Apr, p.976-94. 2007.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. Nueva York: Columbia University Press. 1981

CUTILLO, F.; D'ABROSCA, B.; DELLAGRECA, M.; FIORENTINO, A.; ZARRELLI, A. Terpenoids and phenol derivatives from *Malva silvestris*. **Phytochemistry**, v.67, n.5, Mar, p.481-5. 2006.

CZEPAS, J.; GWOZDZINSKI, K. The flavonoid quercetin: possible solution for anthracycline-induced cardiotoxicity and multidrug resistance. **Biomed Pharmacother**, v.68, n.8, Oct, p.1149-59. 2014.

DANIELA, A.; PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CICCONI, R.; KAROU, D.; D'ARCANGELO, G.; CANINI, A. Identification of phenolic compounds from medicinal and melliferous plants and their cytotoxic activity in cancer cells. **Caryologia**, n.60, p.90-5. 2007.

DARLENSKI, R.; KAZANDJIEVA, J.; TSANKOV, N.; FLUHR, J. W. Acute irritant threshold correlates with barrier function, skin hydration and contact hypersensitivity in atopic dermatitis and rosacea. **Exp Dermatol**, v.22, n.11, Nov, p.752-3. 2013.

DE SOUZA, G. C.; HAAS, A. P.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **J Ethnopharmacol**, v.90, n.1, Jan, p.135-43. 2004.

DEBENEDICTIS, C.; JOUBEH, S.; ZHANG, G.; BARRIA, M.; GHOHESTANI, R. F. Immune functions of the skin. **Clin Dermatol**, v.19, n.5, Sep-Oct, p.573-85. 2001.

DELLAGRECA, M.; CUTILLO, F.; D'ABROSCA, B.; FIORENTINO, A.; PACIFICO, S.; ZARRELLI, A. Antioxidant and radical scavenging properties of *Malva sylvestris*. **Nat Prod Commun**, v.4, n.7, Jul, p.893-6. 2009.

DESIDERI, D.; MELI, M. A.; ROSELLI, C. Determination of essential and non-essential elements in some medicinal plants by polarised X ray fluorescence spectrometer (EDPXRF). **Microchemical Journal**, v.95, n.2, Jul, p.174-180. 2010.

DESSINIOTI, C.; STRATIGOS, A. J.; RIGOPOULOS, D.; KATSAMBAS, A. D. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. **Exp Dermatol**, v.18, n.9, Sep, p.741-9. 2009.

DRAELOS, Z. D. The cosmeceutical realm. **Clin Dermatol**, v.26, n.6, Nov-Dec, p.627-32. 2008.

DUVERNOY, H. M.; RISOLD, P. Y. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. **Brain Res Rev**, v.56, n.1, Nov, p.119-47. 2007.

EL GHAOUI, W. B.; GHANEM, E. B.; CHEDID, L. A.; ABDELNOOR, A. M. The effects of *Alcea rosea* L., *Malva sylvestris* L. and *Salvia libanotica* L. water extracts on the production of anti-egg albumin antibodies, interleukin-4, gamma interferon and interleukin-12 in BALB/c mice. **Phytother Res**, v.22, n.12, Dec, p.1599-604. 2008.

ELLER, M. S.; YAAR, M.; GILCHREST, B. A. DNA damage and melanogenesis. **Nature**, v.372, n.6505, Dec 1, p.413-4. 1994.

ELSAGH, M.; FARTOOKZADEH, M. R.; KAMALINEJAD, M.; ANUSHIRAVANI, M.; FEIZI, A.; BEHBAHANI, F. A.; RAFIEI, R.; ARJMANDPOUR, A.; ADIBI, P. Efficacy of the *Malva sylvestris* L. flowers aqueous extract for functional constipation: A placebo-controlled trial. **Complement Ther Clin Pract**, Mar 7. 2015.

EMA. **ICH Topic S 2 B - Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals**. CPMP/ICH/174/95. London: EMEA 1998.

EMEA. **Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC) - Guideline on The Assessment of Genotoxicity of Herbal Substances/Preparations**. London: EMEA/HMPC/107079/2007 2008.

ESTEVEZ, P. F.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; CAMPOS-BUZZI, F.; MEIRA, A. V.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive Activity of *Malva sylvestris* L. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, n.3, p.454-6. 2009.

EZZEDINE, K.; LIM, H. W.; SUZUKI, T.; KATAYAMA, I.; HAMZAVI, I.; LAN, C. C.; GOH, B. K.; ANBAR, T.; SILVA DE CASTRO, C.; LEE, A. Y.; PARSAD, D.; VAN GEEL, N.; LE POOLE, I. C.; OISO, N.; BENZEKRI, L.; SPRITZ, R.; GAUTHIER, Y.; HANN, S. K.; PICARDO, M.; TAIEB, A.; VITILIGO GLOBAL ISSUE CONSENSUS CONFERENCE, P. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.25, n.3, May, p.E1-13. 2012.

FANTI, P. A.; DIKA, E.; VACCARI, S.; MISCIAL, C.; VAROTTI, C. Generalized psoriasis induced by topical treatment of actinic keratosis with imiquimod. **Int J Dermatol**, v.45, n.12, Dec, p.1464-5. 2006.

FARINA, A.; DOLDO, A.; COTICHINI, V.; RAJEVIC, M.; QUAGLIA, M. G.; MULINACCI, N.; VINCIERI, F. F. HPTLC and reflectance mode densitometry of

anthocyanins in *Malva sylvestris* L.: a comparison with gradient-elution reversed-phase HPLC **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.14, p.203-11. 1995.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. (2000). In: 4. **Malva (Monografia 97)**Atheneu: 97.

FDA. **Guidance for Industry S2B Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals**. Rockville: Food and Drug Administration 1997.

FERREIRA, A.; PROENCA, C.; SERRALHEIRO, M. L.; ARAUJO, M. E. The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. **J Ethnopharmacol**, v.108, n.1, Nov 3, p.31-7. 2006.

FISTAROL, S. K.; ITIN, P. H. Disorders of pigmentation. **J Dtsch Dermatol Ges**, v.8, n.3, Mar, p.187-201; quiz 201-2. 2010.

FONACIER, L.; BERNSTEIN, D. I.; PACHECO, K.; HOLNESS, D. L.; BLESSING-MOORE, J.; KHAN, D.; LANG, D.; NICKLAS, R.; OPPENHEIMER, J.; PORTNOY, J.; RANDOLPH, C.; SCHULLER, D.; SPECTOR, S.; TILLES, S.; WALLACE, D. Contact dermatitis: a practice parameter-update 2015. **J Allergy Clin Immunol Pract**, v.3, n.3 Suppl, May-Jun, p.S1-39. 2015.

FORSCHNER, T.; BUCHHOLTZ, S.; STOCKFLETH, E. Current state of vitiligo therapy--evidence-based analysis of the literature. **J Dtsch Dermatol Ges**, v.5, n.6, Jun, p.467-75. 2007.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v.160, n.2, Jan 5, p.171-7. 2006.

FRANOVA, S.; NOSALOVA, G.; MOKRY, J. Phytotherapy of cough. **Advanc Phytom** v.2, p.111-31. 2006.

FREINKEL, R. K.; WOODLEY, D. **The biology of the skin**. NY: Parthenon Pub. Group. 2001

FRENZILLI, G.; BOSCO, E.; BARALE, R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. **Mutat Res**, v.468, n.2, Jul 10, p.93-108. 2000.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS, B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutat Res**, v.681, n.1, Jan-Feb, p.80-92. 2009.

FRY, L.; BAKER, B. S.; POWLES, A. V. Psoriasis--A possible candidate for vaccination. **Autoimmunity Reviews**, v.6, n.5, p.286-289. 2007.

FUCHS, E. Skin stem cells: rising to the surface. **Cell Biology**, v.180, n.2, p.273-84. 2008.

FUJII, T.; SAITO, M. Inhibitory effect of quercetin isolated from rose hip (*Rosa canina* L.) against melanogenesis by mouse melanoma cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.73, n.9, Sep, p.1989-93. 2009.

GABOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, p.24-37. 2000.

GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó. 2000

GANTZ, I.; FONG, T. M. The melanocortin system. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.284, n.3, Mar, p.E468-74. 2003.

GARG, B. J.; SARASWAT, A.; BHATIA, A.; KATARE, O. P. Topical treatment in vitiligo and the potential uses of new drug delivery systems. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.76, n.3, May-Jun, p.231-8. 2010.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A. G.; MARU, G. B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v.29, n.6, Jun, p.1249-57. 2008.

GASPARETTO, J. C.; MARTINS, C. A.; HAYASHI, S. S.; OTUKY, M. F.; PONTAROLO, R. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. **J Pharm Pharmacol**, v.64, n.2, Feb, p.172-89. 2012.

GHASEMI PIRBALOUTI, A.; AZIZI, S.; KOOHPAYEH, A. Healing potential of iranian traditional medicinal plants on burn wounds in alloxan-induced diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.22, n.2, p.397-403. 2012.

GILLIET, M.; CONRAD, C.; GEIGES, M.; COZZIO, A.; THURLIMANN, W.; BURG, G.; NESTLE, F. O.; DUMMER, R. Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors. **Arch Dermatol**, v.140, n.12, Dec, p.1490-5. 2004.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory Resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v.3, n.5, p.401-416. 2004.

GONG, Z.; LAI, W.; ZHAO, G.; WANG, X.; ZHENG, M.; LI, L.; YANG, Q.; DANG, Y.; LIU, L.; ZOU, Y. Efficacy and safety of fluocinolone acetonide, hydroquinone, and tretinoin cream in chinese patients with melasma: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, parallel-group study. **Clin Drug Investig**, v.35, n.6, Jun, p.385-95. 2015.

GRUBAUER, G.; ELIAS, P. M.; FEINGOLD, K. R. Transepidermal water loss: the signal for recovery of barrier structure and function. **J Lipid Res**, v.30, n.3, Mar, p.323-33. 1989.

GUARRERA, P. M. Food medicine and minor nourishment in the folk traditions of Central Italy (Marche, Abruzzo and Latium). **Fitoterapia**, v.74, n.6, Sep, p.515-44. 2003.

GUDJONSSON, J. E.; ELDER, J. T. Psoriasis: epidemiology. **Clin Dermatol**, v.25, n.6, Nov-Dec, p.535-46. 2007.

GUPTA, D.; KUMARI, R.; THAPPA, D. M. Depigmentation therapies in vitiligo. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v.78, n.1, Jan-Feb, p.49-58. 2012.

HAAKE, A.; SCOTT, G. A.; HOLBROOK, K. A. Structure and function of the skin: Overview of the epidermis and dermis. The Biology of the Skin. (2001). In: **The Biology of the Skin**. Parthenon Publishing:

HAKOZAKI, T.; SWANSON, C. L.; BISSETT, D. L. Hiperpigmentation in Anging Skin. (2010). In: Farage, M. A.; Miller, K. W.; Maibach, H. I. **Textbook of Aging Skin**Spring: 495-501.

HALDER, R. M.; GRIMES, P. E.; MCLAURIN, C. I.; KRESS, M. A.; KENNEY, J. A., JR. Incidence of common dermatoses in a predominantly black dermatologic practice. **Cutis**, v.32, n.4, Oct, p.388, 390. 1983.

HALDER, R. M.; RICHARDS, G. M. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. **Skin Therapy Lett**, v.9, n.6, Jun-Jul, p.1-3. 2004.

HANDEL, A. C.; MIOT, L. D.; MIOT, H. A. Melasma: a clinical and epidemiological review. **An Bras Dermatol**, v.89, n.5, Sep-Oct, p.771-82. 2014.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicol Lett**, v.90, n.2-3, Feb 7, p.183-8. 1997.

HEARING, V. J. Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v.4, n.1, Sep, p.24-8. 1999.

HENRY, A. G.; PIPERNO, D. R. Using plant microfossils from dental calculus to recover human diet: a case study from Tell al-Raqā'i, Syria. **J Archaeol Sci**, n.35, p.1943-50. 2008.

HERMANNNS, J. F. Assessment of topical hypopigmenting agents on solar lentigines fo Asian women. **Dermatology**, v.204, p.286-86. 2002.

HEXSEL, D.; LACERDA, D. A.; CAVALCANTE, A. S.; MACHADO FILHO, C. A.; KALIL, C. L.; AYRES, E. L.; AZULAY-ABULAFIA, L.; WEBER, M. B.; SERRA, M. S.; LOPES, N. F.; CESTARI, T. F. Epidemiology of melasma in Brazilian patients: a multicenter study. **Int J Dermatol**, v.53, n.4, Apr, p.440-4. 2014.

HICSONMEZ, U.; EREES, F. S.; OZDEMIR, C.; OZDEMIR, A.; CAM, S. Determination of Major and Minor Elements in the *Malva sylvestris* L. from Turkey Using ICP-OES Techniques. **Biological Trace Element Research**, v.128, n.3, Jun, p.248-257. 2009.

HIGGINS, J. P. T.; GREEN, S. **Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 5.1.0 [updated March 2011]**: The Cochrane Collaboration. 2011

HJULER, K. F.; OTKJAER, A. [Allergic contact dermatitis caused by temporary black henna tattoos in two siblings.]. **Ugeskr Laeger**, v.176, n.12, Jun 9. 2014.

HOEK-VAN DEN HIL, E. F.; VAN SCHOTHORST, E. M.; VAN DER STELT, I.; HOLLMAN, P. C.; KEIJER, J.; RIETJENS, I. M. Quercetin tests negative for genotoxicity in transcriptome analyses of liver and small intestine of mice. **Food Chem Toxicol**, v.81, Jul, p.34-9. 2015.

HOVHANNISYAN, G. G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Mol Cytogenet**, v.3, p.17. 2010.

HUEBER, A. J.; MCINNES, I. B. Immune regulation in psoriasis and psoriatic arthritis—Recent developments. **Immunology Letters**, v.114, n.2, p.59-65. 2007.

HUSSAIN, L.; IKRAM, J.; REHMAN, K.; TARIQ, M.; IBRAHIM, M.; AKASH, M. S. H. Hepatoprotective effects of *Malva sylvestris* L. against paracetamol-induced hepatotoxicity. **Turkish Journal of Biology**, v.38, p.396-402. 2014.

HYUN, S. K.; LEE, W. H.; JEONG DA, M.; KIM, Y.; CHOI, J. S. Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. **Biol Pharm Bull**, v.31, n.1, Jan, p.154-8. 2008.

ICH-S2(R1). **Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceutical Intended for Human Use S2 (R1)**. 2011. ICH Expert Working Group, Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf. Acesso em: jan

ICH. **International Conference on Harmonisation; guidance on S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals intended for Human Use; availability. Notice** Food, D. A. 77: 33748-9 p. 2012.

IDOLO, M.; MOTTI, R.; MAZZOLENI, S. Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines). **J Ethnopharmacol**, v.127, n.2, Feb 3, p.379-95. 2010.

IMEN, M. B.; CHAABANE, F.; NADIA, M.; SOUMAYA, K. J.; KAMEL, G.; LEILA, C. G. Anti-melanogenesis and antigenotoxic activities of eriodictyol in murine melanoma (B16-F10) and primary human keratinocyte cells. **Life Sci**, Jul 2. 2015.

ISHTIAQ, M.; HANIF, W.; KHAN, M. A.; ASHRAF, M.; BUTT, A. M. An ethnomedicinal survey and documentation of important medicinal folklore food phytonims of flora of

Samahni valley, (Azad Kashmir) Pakistan. **Pak J Biol Sci**, v.10, n.13, Jul 1, p.2241-56. 2007.

IYER, V. R.; EISEN, M. B.; ROSS, D. T.; SCHULER, G.; MOORE, T.; LEE, J. C.; TRENT, J. M.; STAUDT, L. M.; HUDSON, J., JR.; BOGUSKI, M. S.; LASHKARI, D.; SHALON, D.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P. O. The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. **Science**, v.283, n.5398, Jan 1, p.83-7. 1999.

JACOBI, A.; MAHLER, V.; SCHULER, G.; HERTL, M. Treatment of inflammatory dermatoses by tumour necrosis factor antagonists. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.20, n.10, Nov, p.1171-87. 2006.

JACOBSON, C. C.; KUMAR, S.; KIMBALL, A. B. Latitude and psoriasis prevalence. **J Am Acad Dermatol**, v.65, n.4, Oct, p.870-3. 2011.

JANG, M.; PEZZUTO, J. M. Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin. **Cancer Letters**, v.134, n.1, p.81-89. 1998.

JANG, Y. H.; PARK, J. Y.; PARK, Y. J.; KANG, H. Y. Changes in Melanin and Melanocytes in Mottled Hypopigmentation after Low-Fluence 1,064-nm Q-Switched Nd:YAG Laser Treatment for Melasma. **Ann Dermatol**, v.27, n.3, Jun, p.340-2. 2015.

JO, D.; CHOE, D.; NAM, K.; SHIN, C. S. Biological evaluation of novel derivatives of the orange pigments from *Monascus* sp. as inhibitors of melanogenesis. **Biotechnol Lett**, v.36, n.8, Aug, p.1605-13. 2014.

KAN, E.; UNDEGER, U.; BALI, M.; BASARAN, N. Assessment of DNA strand breakage by the alkaline COMET assay in dialysis patients and the role of Vitamin E supplementation. **Mutat Res**, v.520, n.1-2, Sep 26, p.151-9. 2002.

KANG, S. H.; KWON, J. Y.; LEE, J. K.; SEO, Y. R. Recent advances in in vivo genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models. **J Cancer Prev**, v.18, n.4, Dec, p.277-88. 2013.

KANITAKIS, J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. **Eur J Dermatol**, v.12, n.4, Jul-Aug, p.390-9; quiz 400-1. 2002.

KASSIE, F.; LAKY, B.; NOBIS, E.; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Genotoxic effects of methyl isothiocyanate. **Mutat Res**, v.490, n.1, Jan 25, p.1-9. 2001.

KASSIE, F.; PARZEFALL, W.; KNASMULLER, S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. **Mutat Res**, v.463, n.1, Jul, p.13-31. 2000.

KEMP, E. H.; GAWKRODGER, D. J.; WATSON, P. F.; WEETMAN, A. P. Immunoprecipitation of melanogenic enzyme autoantigens with vitiligo sera: evidence for cross-reactive autoantibodies to tyrosinase and tyrosinase-related protein-2 (TRP-2). **Clin Exp Immunol**, v.109, n.3, Sep, p.495-500. 1997.

KHAN, S.; REHMAN, S.; KHAN, A. Z.; KHAN, M. A.; SHAH, M. T. Soil and vegetables enrichment with heavy metals from geological sources in Gilgit, northern Pakistan. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.73, n.7, Oct, p.1820-7. 2010.

KHANDELWAL, N.; ABRAHAM, S. K. Protective effects of common anthocyanidins against genotoxic damage induced by chemotherapeutic drugs in mice. **Planta Med**, v.80, n.15, Oct, p.1278-83. 2014.

KILKENNY, C.; BROWNE, W. J.; CUTHILL, I. C.; EMERSON, M.; ALTMAN, D. G. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. **PLoS Biol**, v.8, n.6, p.e1000412. 2010.

KIM, D. C.; RHO, S. H.; KIM, D.; KIM, S. I.; JANG, C. S.; RYU, J. K.; KIM, B. W.; KWEON, C. O.; KIM, H. K.; LEE, S. J. Coumarin, a Lead Compound of Warfarin, Inhibits Melanogenesis via Blocking Adenylyl Cyclase. **American Journal of Biomedical Research**, v.1, n.3, p.43-7. 2013.

KIM, E. H.; KIM, Y. C.; LEE, E. S.; KANG, H. Y. The vascular characteristics of melasma. **J Dermatol Sci**, v.46, n.2, May, p.111-6. 2007.

KIM, H. J.; KIM, I. S.; DONG, Y.; LEE, I. S.; KIM, J. S.; KIM, J. S.; WOO, J. T.; CHA, B. Y. Melanogenesis-inducing effect of circsimaritin through increases in microphthalmia-associated transcription factor and tyrosinase expression. **Int J Mol Sci**, v.16, n.4, p.8772-88. 2015.

KIM, H. Y.; AL., E. Cosmetic composition for anti-oxidation or skin irritation alleviation comprising an extract of a mixture consisting of *Gentiana lutea*, *Malva sylvestris*, *Origanum vulgare*, and *Crataegus oxyacantha*. **Patent Number(s): KR2007095657-A; KR782517-B1**. 2007.

KIM, K. Effect of ginseng and ginsenosides on melanogenesis and their mechanism of action. **J Ginseng Res**, v.39, n.1, Jan, p.1-6. 2015.

KIM, M. J.; KIM, D. S.; YOON, H. S.; LEE, W. J.; LEE, N. H.; HYUN, C. G. Melanogenesis inhibitory activity of Korean *Undaria pinnatifida* in mouse B16 melanoma cells. **Interdiscip Toxicol**, v.7, n.2, Jun, p.89-92. 2014.

KIRKLAND, D.; ZEIGER, E.; MADIA, F.; GOODERHAM, N.; KASPER, P.; LYNCH, A.; MORITA, T.; OUEDRAOGO, G.; PARRA MORTE, J. M.; PFUHLER, S.; ROGIERS, V.; SCHULZ, M.; THYBAUD, V.; VAN BENTHEM, J.; VANPARYS, P.; WORTH, A.; CORVI, R. Can *in vitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v.775-776, Dec, p.55-68. 2014.

KOVALIK, A. C.; BISETTO, P.; POCHAPSKI, M. T.; CAMPAGNOLI, E. B.; PILATTI, G. L.; SANTOS, F. A. Effects of an Orabase Formulation with Ethanolic Extract of *Malva sylvestris* L. in Oral Wound Healing in Rats. **J Med Food**, Jan. 2014.

KÜLTÜR, S. Medicinal plants used in Kı{dotless}rklareli Province (Turkey). **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, n.2, p.341-364. 2007.

LAFFON, B.; PASARO, E.; MENDEZ, J. DNA damage and repair in human leukocytes exposed to styrene-7,8-oxide measured by the comet assay. **Toxicol Lett**, v.126, n.1, Jan 5, p.61-8. 2002.

LAFLAMME, N.; RIVEST, S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. **FASEB J**, v.15, n.1, Jan, p.155-163. 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. (2000). In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; De-Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento** Universidade/UFRGS/UFSC:

LARDOS, A. The botanical materia medica of the Iatrosophikon--a collection of prescriptions from a monastery in Cyprus. **J Ethnopharmacol**, v.104, n.3, Apr 6, p.387-406. 2006.

LAWRENCE, T.; GILROY, D. W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v.88, n.2, p.85-94. 2007.

LE POOLE, I. C.; LUITEN, R. M. Autoimmune etiology of generalized vitiligo. **Curr Dir Autoimmun**, v.10, p.227-43. 2008.

LEÃO, A. R.; DA CUNHA, L. C.; PARENTE, L. M. L.; CASTRO, L. C. M.; CHAUL, A.; CARVALHO, H. E.; RODRIGUES, V. B.; BASTOS, M. A. Avaliação Clínica Toxicológica Preliminar do Viticromin α em Pacientes com Vitiligo. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.1, p.15-23. 2005.

LEE, D. Y.; CHOO, B. K.; YOON, T.; CHEON, M. S.; LEE, H. W.; LEE, A. Y.; KIM, H. K. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.121, n.1, p.28-34. 2009.

LEE, H. S.; WON, C. H.; LEE, D. H.; AN, J. S.; CHANG, H. W.; LEE, J. H.; KIM, K. H.; CHO, S.; CHUNG, J. H. Treatment of melasma in Asian skin using a fractional 1,550-nm laser: an open clinical study. **Dermatol Surg**, v.35, n.10, Oct, p.1499-504. 2009.

LEONTI, M.; CASU, L.; SANNA, F.; BONSIGNORE, L. A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily-De Materia Medica revisited? **J Ethnopharmacol**, v.121, n.2, Jan 21, p.255-67. 2009.

LEPORATTI, M. L.; CORRADI, L. Ethnopharmacobotanical remarks on the province of Chieti town (Abruzzo, central Italy). **J Ethnopharmacol**, v.74, n.1, Jan, p.17-40. 2001.

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sci**, v.8, n.11, Jun 1, p.601-6. 1969.

LI, K.; ARMSTRONG, A. W. A review of health outcomes in patients with psoriasis. **Dermatol Clin**, v.30, n.1, Jan, p.61-72, viii. 2012.

LIBERATI, A.; ALTMAN, D. G.; TETZLAFF, J.; MULROW, C.; GOTZSCHE, P. C.; IOANNIDIS, J. P.; CLARKE, M.; DEVEREAUX, P. J.; KLEIJNEN, J.; MOHER, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. **BMJ**, v.339, p.b2700. 2009.

LIDEN, C. Nickel allergy following EU regulation--more action is needed. **Br J Dermatol**, v.169, n.4, Oct, p.733. 2013.

LIEW, F. Y. The role of innate cytokines in inflammatory response. **Immunol Lett**, v.85, n.2, Jan 22, p.131-4. 2003.

LOWES, M. A.; BOWCOCK, A. M.; KRUEGER, J. G. Pathogenesis and therapy of psoriasis. **Nature**, v.445, n.7130, Feb 22, p.866-73. 2007.

MAGRO, A.; CAROLINO, M.; BASTOS, M.; MEXIA, A. Efficacy of plant extracts against stored-products fungi. **Rev Iberoam Micol**, v.23, n.3, Sep, p.176-8. 2006.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C. C.; GERMAN NATIONAL GENOME RESEARCH, N. The skin as a mirror of the aging process in the human organism--state of the art and results of the aging research in the German National Genome Research Network 2 (NGFN-2). **Exp Gerontol**, v.42, n.9, Sep, p.879-86. 2007.

MAN, M.-Q.; SHI, Y.; MAN, M.; LEE, S. H.; DEMERJIAN, M.; CHANG, S.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Experimental Dermatology**, v.17, n.8, p.681-687. 2008.

MAN, M. Q.; SHI, Y.; MAN, M.; LEE, S. H.; DEMERJIAN, M.; CHANG, S.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Chinese herbal medicine (Tuhuai extract) exhibits topical anti-proliferative and anti-inflammatory activity in murine disease models. **Exp Dermatol**, v.17, n.8, Aug, p.681-7. 2008.

MANTLE, D.; GOK, M. A.; LENNARD, T. W. Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders. **Adverse Drug React Toxicol Rev**, v.20, n.2, Jun, p.89-103. 2001.

MAROUANE, W.; SOUSSI, A.; MURAT, J. C.; BEZZINE, S.; EL FEKI, A. The protective effect of *Malva sylvestris* on rat kidney damaged by vanadium. **Lipids Health Dis**, v.10, p.65. 2011.

MARTINAZZO, A. P.; MARTINS, T. Plantas medicinais utilizadas pela população de Cascavel/PR

Medicinal plants used by the population of Cascavel/PR. **Arq. ciências saúde UNIPAR**, v.8, n.1, 2004/01PY - 2004, p.3-5.

MARTINS, C. A.; WEFFORT-SANTOS, A. M.; GASPARETTO, J. C.; TRINDADE, A. C.; OTUKI, M. F.; PONTAROLO, R. *Malva sylvestris* L. extract suppresses desferrioxamine-induced PGE(2) and PGD(2) release in differentiated U937 cells: the development and validation of an LC-MS/MS method for prostaglandin quantification. **Biomed Chromatogr**, v.28, n.7, Jul, p.986-93. 2014.

MATCHETT, M. D.; MACKINNON, S. L.; SWEENEY, M. I.; GOTTSCHALL-PASS, K. T.; HURTA, R. A. Blueberry flavonoids inhibit matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells. **Biochem Cell Biol**, v.83, n.5, Oct, p.637-43. 2005.

MELCHIOR, H. **Adolf Engler (Ed.) Syllabus der Pflanzenfamilien**, v.II. 1964

MIKAILI, P.; SHAYEGH, J.; ASGHARI, M. H. Review on the indigenous use and ethnopharmacology of hot and cold natures of phytomedicines in the Iranian traditional medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.2 SUPPL., p.S1189-S1193. 2012.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G.; MARQUES, M. E. A. Physiopathology of melasma. **An Bras Dermatol**, v.84, n.6, p.623-35. 2009.

MIRALDI, E.; FERRI, S.; MOSTAGHIMI, V. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, n.2-3, p.77-87. 2001.

MONARCA, S.; FERETTI, D.; ZANARDINI, A.; MORETTI, M.; VILLARINI, M.; SPIEGELHALDER, B.; ZERBINI, I.; GELATTI, U.; LEBBOLO, E. Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. **Mutat Res**, v.490, n.2, Feb 20, p.159-69. 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, Dec 16, p.55-63. 1983.

MURAKAWA, M.; YAMAOKA, K.; TANAKA, Y.; FUKUDA, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v.71, n.9, p.1331-1336. 2006.

NEGISHI, K.; KUSHIKATA, N.; TEZUKA, Y.; TAKEUCHI, K.; MIYAMOTO, E.; WAKAMATSU, S. Study of the incidence and nature of "very subtle epidermal melasma" in relation to intense pulsed light treatment. **Dermatol Surg**, v.30, n.6, Jun, p.881-6; discussion 886. 2004.

NESTLE, F. O.; DI MEGLIO, P.; QIN, J. Z.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v.9, n.10, Oct, p.679-91. 2009.

NESTLE, F. O.; KAPLAN, D. H.; BARKER, J. Psoriasis. **N Engl J Med**, v.361, n.5, Jul 30, p.496-509. 2009.

NICOLAIDOU, E.; KATSAMBAS, A. D. Pigmentation disorders: hyperpigmentation and hypopigmentation. **Clin Dermatol**, v.32, n.1, Jan-Feb, p.66-72. 2014.

NOHYNEK, G. J.; KIRKLAND, D.; MARZIN, D.; TOUTAIN, H.; LECLERC-RIBAUD, C.; JINNAI, H. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food Chem Toxicol**, v.42, n.1, Jan, p.93-105. 2004.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test [the Ames test]. (Original Guideline, adopted 21st July 1997).** Organisation for Economic Co-operation and Development. 471 1997a.

_____. **Guidelines for the Testing of Chemicals No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test [*in vivo* micronucleus test]. (Original Guideline, adopted 21st July 1997).** Organisation for Economic Co-operation and Development 474 1997b.

_____. **Guideline for the testing of chemicals No. 473: *In vitro* mammalian chromosomal aberration test:** Organisation for Economic Co-operation and Development. 473 2014a.

_____. **Guideline for the testing of chemicals No. 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test:** Organisation for Economic Co-operation and Development. 474 2014b.

_____. **Guideline for the testing of chemicals No. 475: Mammalian bone marrow chromosomal aberration test:** Organisation for Economic Co-operation and Development. 475 2014c.

_____. **Guideline for the testing of chemicals No. 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test** Organisation for Economic Co-operation and Development. 487 2014d.

_____. **Guideline for the testing of chemicals No. 489: *In vivo* mammalian alkaline comet assay:** Organisation for Economic Co-operation and Development. 489 2014e.

OHYAMA, M.; TERUNUMA, A.; TOCK, C. L.; RADONOVICH, M. F.; PISE-MASISON, C. A.; HOPPING, S. B.; BRADY, J. N.; UDEY, M. C.; VOGEL, J. C. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. **J Clin Invest**, v.116, n.1, Jan, p.249-60. 2006.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. **Radiat. Res.**, v.122, n.1, Apr, p.86-94. 1990.

OLIVEIRA, S. G. D.; DE MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. D. S.; PINO, F. A. B. D.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, n.2, p.428-437. 2012.

ORDIZ, I. Melanina y agentes despigmentantes. **Revista de Medicina Estética**, 2003, Disponível em: <<http://www.med-estetica.com/Cientifica/Revista/n10/melanina.htm>>. Acesso em: 2003.

ORSOLIC, N.; CAR, N. Quercetin and hyperthermia modulate cisplatin-induced DNA damage in tumor and normal tissues in vivo. **Tumour Biol**, v.35, n.7, Jul, p.6445-54. 2014.

ORTONNE, J. P. Aetiology and pathogenesis of psoriasis. **Br J Dermatol**, v.135 Suppl 49, Oct, p.1-5. 1996.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, Â.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v.507, n.1-3, p.253-259. 2005.

OUEDRAOGO, M.; BAUDOUX, T.; STÉVIGNY, C.; NORTIER, J.; COLET, J. M.; EFFERTH, T.; QU, F.; ZHOU, J.; CHAN, K.; SHAW, D.; PELKONEN, O.; DUEZ, P. Review of current and "omics" methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, n.3, p.492-512. 2012.

PASSERON, T. Melasma pathogenesis and influencing factors - an overview of the latest research. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v.27 Suppl 1, Jan, p.5-6. 2013.

PENG, H. Y.; LIN, C. C.; WANG, H. Y.; SHIH, Y.; CHOU, S. T. The melanogenesis alteration effects of *Achillea millefolium* L. essential oil and linalyl acetate: involvement of oxidative stress and the JNK and ERK signaling pathways in melanoma cells. **PLoS One**, v.9, n.4, p.e95186. 2014.

PERERA, G. K.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. Psoriasis. **Annu Rev Pathol**, v.7, p.385-422. 2012.

PERIASAMY, R.; KALAL, I. G.; KRISHNASWAMY, R.; VISWANADHA, V. Quercetin protects human peripheral blood mononuclear cells from OTA-induced oxidative stress, genotoxicity, and inflammation. **Environ Toxicol**, Dec 23. 2014.

PETIT, L.; PIERARD, G. E. Skin-lightening products revisited. **Int J Cosmet Sci**, v.25, n.4, Aug, p.169-81. 2003.

PIETRZAK, A. T.; ZALEWSKA, A.; CHODOROWSKA, G.; KRASOWSKA, D.; MICHALAK-STOMA, A.; NOCKOWSKI, P.; OSEMLAK, P.; PASZKOWSKI, T.; ROLIŃSKI, J. M. Cytokines and anticytokines in psoriasis. **Clinica Chimica Acta**, v.394, n.1-2, p.7-21. 2008.

PIRBALOUTI, A. G.; AZIZI, S.; KOOHPAYEH, A.; HAMEDI, B. Wound healing activity of *Malva sylvestris* and *Punica granatum* in alloxan-induced diabetic rats. **Acta Pol Pharm**, v.67, n.5, Sep-Oct, p.511-6. 2010.

PLENCK, J. J. Doctrina de Morbis Cutaneis. Qua hi morbi in suas classes, genera et species redingtur. (1776). In: Handel, A. C.; Miot, L. D.; Miot, H. A. **Melasma: a clinical and epidemiological review**. v.89An Bras Dermatol: 771-82. 2014.

POLLIO, A.; DE NATALE, A.; APPETITI, E.; ALIOTTA, G.; TOUWAIDE, A. Continuity and change in the Mediterranean medical tradition: *Ruta* spp. (rutaceae) in Hippocratic medicine and present practices. **J Ethnopharmacol**, v.116, n.3, Mar 28, p.469-82. 2008.

POURRAT, H.; TEXIER, O.; BARTHOMEUF, C. Identification and Assay of Anthocyanin Pigments in *Malva Sylvestris* L. . **Pharma Acta Hel** v.65, n.3, p.93-6. 1990.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, n.12, p.1063-1072. 2008.

PRUDENTE, A. S. **O papel da *Malva sylvestris* em modelos inflamatórios de pele de camundongos**. 90 p. (Mestrado). Farmacologia, UFPR, Universidade Federal do Paraná, 2010.

_____. **Investigação da atividade antiproliferativa em queratinócitos de uma planta milenar: *Malva sylvestris* L.** (Doutorado). Farmacologia, UFPR, Universidade Federal do Paraná, 2013.

PRUDENTE, A. S.; LODDI, A. M.; DUARTE, M. R.; SANTOS, A. R.; POCHAPSKI, M. T.; PIZZOLATTI, M. G.; HAYASHI, S. S.; CAMPOS, F. R.; PONTAROLO, R.; SANTOS, F. A.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Pre-clinical anti-inflammatory aspects of a cuisine and medicinal millennial herb: *Malva sylvestris* L. **Food Chem Toxicol**, v.58, Aug, p.324-31. 2013.

QUARANTA, M.; EYERICH, S.; KNAPP, B.; NASORRI, F.; SCARPONI, C.; MATTII, M.; GARZORZ, N.; HARLFINGER, A. T.; JAEGER, T.; GROESBER, M.; PENNINO, D.; MEMPEL, M.; SCHNOPP, C.; THEIS, F. J.; ALBANESI, C.; CAVANI, A.; SCHMIDT-WEBER, C. B.; RING, J.; EYERICH, K. Allergic contact dermatitis in psoriasis patients: typical, delayed, and non-interacting. **PLoS One**, v.9, n.7, p.e101814. 2014.

QUAVE, C. L.; PIERONI, A.; BENNETT, B. C. Dermatological remedies in the traditional pharmacopoeia of Vulture-Alto Bradano, inland southern Italy. **J Ethnobiol Ethnomed**, v.4, p.5. 2008.

QUAVE, C. L.; PLANO, L. R.; PANTUSO, T.; BENNETT, B. C. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **J Ethnopharmacol**, v.118, n.3, Aug 13, p.418-28. 2008.

RAETZ, C. R.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, v.71, p.635-700. 2002.

RAJAN, N.; LANGTRY, J. A. Generalized exacerbation of psoriasis associated with imiquimod cream treatment of superficial basal cell carcinomas. **Clin Exp Dermatol**, v.31, n.1, Jan, p.140-1. 2006.

RAJARATNAM, R.; HALPERN, J.; SALIM, A.; EMMETT, C. Interventions for melasma. **Cochrane Database Syst Rev**, n.7, p.CD003583. 2010.

RAMKUMAR, K. M.; SANKAR, L.; MANJULA, C.; KRISHNAMURTHI, K.; SARAVANA DEVI, S.; CHAKRABARTI, T.; KALAISELVI, K.; PALANIVEL, M.; RAJAGURU, P. Antigenotoxic potential of gymnema montanum leaves on DNA damage in human peripheral blood lymphocytes and HL-60 cell line. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.51, n.4, p.285-293. 2010.

RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, n.5, May, p.603-13. 2001.

RAZAVI, S. M.; ZARRINI, G.; MOLAVI, G.; GHASEMI, G. Bioactivity of malva sylvestris L., a medicinal plant from iran. **Iran J Basic Med Sci**, v.14, n.6, Nov, p.574-9. 2011.

REICH, K.; MROWIETZ, U.; KARAKASILI, E.; ZSCHOCKE, I. Development of an adherence-enhancing intervention in topical treatment termed the topical treatment optimization program (TTOP). **Arch Dermatol Res**, v.306, n.7, Sep, p.667-76. 2014.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H., 3RD; WOSTER, P. M.; SVENSSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochem Pharmacol**, v.55, Mar 15, p.803-10. 1998.

RENDON, M. I. Utilizing combination therapy to optimize melasma outcomes. **J Drugs Dermatol**, v.3, n.5 Suppl, Sep-Oct, p.S27-34. 2004.

RIETSCHEL, E. T.; BRADE, H. Bacterial endotoxins. **Sci Am**, v.267, n.2, Aug, p.54-61. 1992.

SABAT, R.; PHILIPP, S.; HOFLICH, C.; KREUTZER, S.; WALLACE, E.; ASADULLAH, K.; VOLK, H. D.; STERRY, W.; WOLK, K. Immunopathogenesis of psoriasis. **Exp Dermatol**, v.16, n.10, Oct, p.779-98. 2007.

SAMPAIO, A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia Básica**. São Paulo: Artes Médicas. 2000

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Discromias. (1998). In. **Dermatologia**. p. 267-83.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. Pele Normal: Anatomia e Fisiologia. (1998). In. **Dermatologia** Artes Médicas: 4-35.

SANDOVAL-CRUZ, M.; GARCIA-CARRASCO, M.; SANCHEZ-PORRAS, R.; MENDOZA-PINTO, C.; JIMENEZ-HERNANDEZ, M.; MUNGUIA-REALPOZO, P.; RUIZ-ARGUELLES, A. Immunopathogenesis of vitiligo. **Autoimmun Rev**, v.10, n.12, Oct, p.762-5. 2011.

SARDAS, S.; KARABIYIK, L.; AYGUN, N.; KARAKAYA, A. E. DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. **Mutat Res**, v.418, n.1, Sep 25, p.1-6. 1998.

SARKAR, R.; ARORA, P.; GARG, V. K.; SONTHALIA, S.; GOKHALE, N. Melasma update. **Indian Dermatol Online J**, v.5, n.4, Oct, p.426-35. 2014.

SCHACKE, H.; DOCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacol Ther**, v.96, n.1, Oct, p.23-43. 2002.

SCHÄCKE, H.; DÖCKE, W. D.; ASADULLAH, K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. **Pharmacology & therapeutics**, v.96, n.1, p.23-43. 2002.

SCHAKEL, K.; DOBEL, T.; BOSSELMANN, I. Future treatment options for atopic dermatitis - small molecules and beyond. **J Dermatol Sci**, v.73, n.2, Feb, p.91-100. 2014.

SCHALLREUTER, K. U.; BAHADORAN, P.; PICARDO, M.; SLOMINSKI, A.; ELASSIUTY, Y. E.; KEMP, E. H.; GIACHINO, C.; LIU, J. B.; LUITEN, R. M.; LAMBE, T.; LE POOLE, I. C.; DAMMAK, I.; ONAY, H.; ZMIJEWSKI, M. A.; DELL'ANNA, M. L.; ZEEGERS, M. P.; CORNALL, R. J.; PAUS, R.; ORTONNE, J. P.; WESTERHOF, W. Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? **Exp Dermatol**, v.17, n.2, Feb, p.139-40; discussion 141-60. 2008.

SCHERRER, A. M.; MOTTI, R.; WECKERLE, C. S. Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). **J Ethnopharmacol**, v.97, n.1, Feb 10, p.129-43. 2005.

SCHOEPE, S.; SCHACKE, H.; MAY, E.; ASADULLAH, K. Glucocorticoid therapy-induced skin atrophy. **Exp Dermatol**, v.15, n.6, Jun, p.406-20. 2006.

SCIENTIFIC-WEB. **Malva sylvestris**. 2011. Disponível em: <<http://www.scientific-web.com/en/Biology/Plants/Magnoliophyta/MalvaSylvestris01.html>>. Acesso em: 04 nov de 2011

SEELIGER, S.; DERIAN, C. K.; VERGNOLLE, N.; BUNNETT, N. W.; NAWROTH, R.; SCHMELZ, M.; VON DER WEID, P.-Y.; BUDDENKOTTE, J.; SUNDERKÖTTER, C.; METZE, D.; ANDRADE-GORDON, P.; HARMS, E.; VESTWEBER, D.; LUGER, T. A.; STEINHOFF, M. Proinflammatory role of proteinase-activated receptor-2 in humans and mice during cutaneous inflammation in vivo. **The FASEB Journal**, v.17, n.13, October 1, 2003, p.1871-1885. 2003.

SEIBERG, M.; AL., E. Enhancing production of mucus of mucosal tissue, for e.g. preventing aging, comprises administering to mucosal tissue, a composition comprising a safe and effective amount of *Malva sylvestris* extract. **Patent Number(s): US2006088616-A1; WO2006047470-A2; EP1811955-A2.** 2006.

SEIBERG, M.; PAINE, C.; SHARLOW, E.; ANDRADE-GORDON, P.; COSTANZO, M.; EISINGER, M.; SHAPIRO, S. S. The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte-melanocyte interactions. **Exp Cell Res**, v.254, n.1, Jan 10, p.25-32. 2000.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.18, n.3, Sep, p.385-405. 2004.

SHIN, I. S.; SEO, C. S.; HA, H. K.; LEE, M. Y.; HUANG, D. S.; HUH, J. I.; SHIN, H.-K. Genotoxicity assessment of Pyungwi-san (PWS), a traditional herbal prescription. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.696-703. 2011.

SHOJI, T.; KOBORI, M.; SHINMOTO, H.; TANABE, M.; TSUSHIDA, T. Progressive effects of phloridzin on melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. **Biosci Biotechnol Biochem**, v.61, n.12, Dec, p.1963-7. 1997.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento.** Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC. 2004

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v.175, n.1, Mar, p.184-91. 1988.

SLEIMAN, N. H.; DAHER, C. F. *Malva sylvestris* water extract: A potential anti-inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. **Planta Med**, v.75, n.9. 2009.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; ELISABETSKY, E. Community home pharmacies in Maquiné (RS) an ethnopharmacological evaluation. **Farmácias caseiras comunitárias do município de Maquiné (RS): Uma avaliação etnofarmacológica**, v.6, n.2, p.83-91. 2004.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods Mol. Biol.**, v.113, p.203-12. 1999.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sci**, v.67, n.5, Jun 23, p.477-502. 2000.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRAMPOSCH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Skin Pharmacol**, v.4, n.4, p.262-71. 1991.

STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discov Today**, v.5, n.2, Feb, p.39-41. 2000.

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. **J Immunol Methods**, v.93, n.2, Nov 6, p.157-65. 1986.

TADOKORO, T.; BONTE, F.; ARCHAMBAULT, J. C.; CAUCHARD, J. H.; NEVEU, M.; OZAWA, K.; NOGUCHI, F.; IKEDA, A.; NAGAMATSU, M.; SHINN, S. Whitening efficacy of plant extracts including orchid extracts on Japanese female skin with melasma and lentigo senilis. **J Dermatol**, v.37, n.6, Jun, p.522-30. 2010.

TAKEDA, K.; ENOKI, S.; HARBORNE, J. B.; EAGLES, J. Malonated anthocyanins in malvaceae: Malonylmalvin from *Malva sylvestris*. **Phytochemistry**, v.28, n.2, p.499-500. 1989.

TARLE, R. G.; NASCIMENTO, L. M.; MIRA, M. T.; CASTRO, C. C. Vitiligo--part 1. **An Bras Dermatol**, v.89, n.3, May-Jun, p.461-70. 2014.

TAYLOR, C. R.; ANDERSON, R. R. Ineffective treatment of refractory melasma and postinflammatory hyperpigmentation by Q-switched ruby laser. **J Dermatol Surg Oncol**, v.20, n.9, Sep, p.592-7. 1994.

TOMITA, Y.; MAEDA, K.; TAGAMI, H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. **Pigment Cell Res**, v.5, n.5 Pt 2, Nov, p.357-61. 1992.

TOMODA, M.; GONDA, R.; SHIMIZU, N.; YAMADA, H. Plant mucilages. XLII. An anti-complementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritiana*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v.37, n.11, Nov, p.3029-32. 1989.

TSUBOI, T.; KONDOH, H.; HIRATSUKA, J.; MISHIMA, Y. Enhanced melanogenesis induced by tyrosinase gene-transfer increases boron-uptake and killing effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma. **Pigment Cell Res**, v.11, n.5, Oct, p.275-82. 1998.

TUIN, A.; HUIZINGA-VAN DER VLAG, A.; VAN LOENEN-WEEMAES, A. M.; MEIJER, D. K.; POELSTRA, K. On the role and fate of LPS-dephosphorylating activity in the rat liver. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v.290, n.2, Feb, p.G377-85. 2006.

TURKEZ, H.; GEYIKOGLU, F. The effect of laurel leaf extract against toxicity induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-P-dioxin in cultured rat hepatocytes. **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v.62, n.4, p.309-315. 2011.

TÜRKEZ, H.; TOĞAR, B. Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract counteracts genotoxicity and oxidative stress of permethrin in human lymphocytes. **Journal of Toxicological Sciences**, v.36, n.5, p.531-537. 2011.

UTHER, M. Kojic acid and its derivatives in cosmetics and health protection. . **Parfuem Kosmet**, v.74, p.554-56. 1993.

VAN DER FITS, L.; MOURITS, S.; VOERMAN, J. S.; KANT, M.; BOON, L.; LAMAN, J. D.; CORNELISSEN, F.; MUS, A. M.; FLORENCIA, E.; PRENS, E. P.; LUBBERTS, E. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. **J Immunol**, v.182, n.9, May 1, p.5836-45. 2009.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Curr Opin Biotechnol**, v.13, n.2, Apr, p.181-7. 2002.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **J Ethnopharmacol**, v.119, n.3, Oct 28, p.575-87. 2008.

VIDEIRA, I. F.; MOURA, D. F.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. **An Bras Dermatol**, v.88, n.1, Jan-Feb, p.76-83. 2013.

VIZOSO PARRA, A.; GARCÍA LÓPEZ, A.; RAMOS RUIZ, A.; PILOTO FERRER, J.; RIVERO MARTÍNEZ, R. Derivados antraquinónicos del *Aloe vera* L Tamizaje genotóxico. **Rev. cuba. plantas med**, v.5, n.2, p.46-50. 2000.

WALTER, S.; LETIEMBRE, M.; LIU, Y.; HEINE, H.; PENKE, B.; HAO, W.; BODE, B.; MANIETTA, N.; WALTER, J.; SCHULZ-SCHUFFER, W.; FASSBENDER, K. Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. **Cell Physiol Biochem**, v.20, n.6, p.947-56. 2007.

WATANABE, E.; TANOMARU, J. M.; NASCIMENTO, A. P.; MATOBA-JUNIOR, F.; TANOMARU-FILHO, M.; YOKO ITO, I. Determination of the maximum inhibitory dilution of cetylpyridinium chloride-based mouthwashes against *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. **J Appl Oral Sci**, v.16, n.4, Jul-Aug, p.275-9. 2008.

WHO. **WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues**. Geneva: World Health Organization. 2007

WILLIMOTT, S.; BARKER, J.; JONES, L. A.; OPARA, E. I. Apoptotic effect of *Oldenlandia diffusa* on the leukaemic cell line HL60 and human lymphocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, n.3, p.290-299. 2007.

WNUK, M.; LEWINSKA, A.; OKLEJEWICZ, B.; BUGNO, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Evaluation of the cyto- and genotoxic activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) in human lymphocytes *in vitro*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.679, n.1-2, p.18-23. 2009.

WOLLENBERG, A.; FEICHTNER, K. Atopic dermatitis and skin allergies - update and outlook. **Allergy**, v.68, n.12, Dec, p.1509-19. 2013.

WOOD, L. C.; JACKSON, S. M.; ELIAS, P. M.; GRUNFELD, C.; FEINGOLD, K. R. Cutaneous barrier perturbation stimulates cytokine production in the epidermis of mice. **J Clin Invest**, v.90, n.2, Aug, p.482-7. 1992.

WU, J. K.; SILLER, G.; STRUTTON, G. Psoriasis induced by topical imiquimod. **Australas J Dermatol**, v.45, n.1, Feb, p.47-50. 2004.

XIE, W.; ZHANG, J.; MA, X.; YANG, W.; ZHOU, Y.; TANG, X.; ZOU, Y.; LI, H.; HE, J.; XIE, S.; ZHAO, Y.; LIU, F. Synthesis and Biological Evaluation of Kojic Acid Derivatives Containing 1,2,4-triazole as Potent Tyrosinase Inhibitors. **Chem Biol Drug Des**, Apr 27. 2015.

YAMAUCHI, K.; MITSUNAGA, T.; INAGAKI, M.; SUZUKI, T. Quercetin derivatives regulate melanosome transportation via EPI64 inhibition and elongate the cell shape of B16 melanoma cells. **Biomed Pharmacother**, v.70, Mar, p.206-12. 2015.

YAMAUCHI, K.; MITSUNAGA, T.; ITAKURA, Y.; BATUBARA, I. Extracellular melanogenesis inhibitory activity and the structure-activity relationships of ugonins from *Helminthostachys zeylanica* roots. **Fitoterapia**, v.104, Jul, p.69-74. 2015.

YANG, L.; WEI, Y.; SUN, Y.; SHI, W.; YANG, J.; ZHU, L.; LI, M. Interferon-gamma Inhibits Melanogenesis and Induces Apoptosis in Melanocytes: A Pivotal Role of CD8+ Cytotoxic T Lymphocytes in Vitiligo. **Acta Derm Venereol**, v.95, n.6, Jun 24, p.664-70. 2015.

YOON, T. J.; LEI, T. C.; YAMAGUCHI, Y.; BATZER, J.; WOLBER, R.; HEARING, V. J. Reconstituted 3-dimensional human skin of various ethnic origins as an in vitro model for studies of pigmentation. **Anal Biochem**, v.318, n.2, Jul 15, p.260-9. 2003.

ZHANG, J.; KURITA, M.; EBINA, K.; UKIYA, M.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; MASTERS, E. T.; SHIMIZU, N.; AKIHISA, M.; FENG, F.; AKIHISA, T. Melanogenesis-inhibitory activity and cancer chemopreventive effect of glucosylcucurbitic acid from shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels. **Chem Biodivers**, v.12, n.4, Apr, p.547-58. 2015.

ZHONG, S. M.; SUN, N.; LIU, H. X.; NIU, Y. Q.; WU, Y. Reduction of facial pigmentation of melasma by topical lignin peroxidase: A novel fast-acting skin-lightening agent. **Exp Ther Med**, v.9, n.2, Feb, p.341-344. 2015.

ZHOU, J. P.; ZHANG, H. B.; QIAN, H.; LIN, L.; HUANG, W. L.; NI, S. J. Synthesis and biological evaluation of aromatase inhibitors. **Lett Drug Design Discov**, v.6, p.181-185. 2009.