

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Produção e avaliação de compostos vegetais adsorvidos em adjuvantes para o
desenvolvimento de novos insumos contra a otite externa canina**

Risciela Salardi Alves de Brito

Pelotas, 2023

Risciela Salardi Alves de Brito

Produção e avaliação de compostos vegetais adsorvidos em adjuvantes para o desenvolvimento de novos insumos contra a otite externa canina

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Márcia de Oliveira Nobre

Coorientador: Sérgio Jorge

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B862p Brito, Risciela Salardi Alves de

Produção e avaliação de compostos vegetais adsorvidos em adjuvantes para o desenvolvimento de novos insumos contra a otite externa canina / Risciela Salardi Alves de Brito ; Márcia de Oliveira Nobre, orientadora ; Sérgio Jorge, coorientador. — Pelotas, 2023.

83 f. : il.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Solução otológica. 2. *Triticum aestivum*. 3. *Bixa orellana*. 4. Tris-edta. 5. N-acetilcisteína. I. Nobre, Márcia de Oliveira, orient. II. Jorge, Sérgio, coorient. III. Título.

CDD : 636.708961781

Risciela Salardi Alves de Brito

Produção e avaliação de compostos vegetais adsorvidos em adjuvantes para o desenvolvimento de novos insumos contra a otite externa canina

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 24/02/2023

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia de Oliveira Nobre (Orientadora)
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dr^a. Mariana Cristina Hoeppepner Rondelli
Doutora em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal – (Unesp)

Prof. Dr. Eduardo Negri Mueller
Doutor em ciências Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas (UFPeI)

Prof^a. Dr^a. Cristina Gevehr Fernandes
Doutora em patologia pela Universidade Estadual Paulista (FMB-Unesp)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família pelo apoio na realização deste sonho, em especial aos meus pais que possibilitaram e apoiaram a concretização, agradeço por todos os esforços, conselhos e amor. Agradeço por estarem comigo em todos os momentos, pelo incentivo e por me tornarem uma pessoa forte.

Aos meus amigos, em especial a todos que estiveram comigo desde o início da minha jornada, se tornaram a minha família e sempre estiveram disponíveis incentivando e me erguendo nos momentos difíceis, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus colegas do Clinpet, agradeço pelos momentos de apoio, convivência e pelo apoio nos experimentos em especial ao Antônio que acompanhou e apoiou todo o experimento. A Clínica veterinária Pronto Pet, por ser meu local de trabalho e ter se tornado a minha segunda casa, agradeço por todo apoio e conhecimentos obtidos.

Ao Laboratório CADAN por ceder o espaço e o conhecimento para a realização das análises bacterianas.

Aos Laboratório MIC-Vet e laboratório de bacteriologia da Ufpel pelo apoio na realização dos testes *in vitro*.

Aos Professores Rogério e Renato, pela formulação dos extratos vegetais e produção das soluções otológicas.

A Minha orientadora Prof. Márcia de Oliveira Nobre, por ter não só orientado, mas também confiado e acreditado no meu potencial se tornando uma fonte de inspiração. Ao meu co-orientador Sérgio Jorge, pelo apoio e auxílio na escrita e montagem do trabalho.

Ao CAPES e a UFPEL pela concessão da bolsa de doutorado e a oportunidade da realização do doutorado.

Por fim, agradeço aos animais fontes de inspiração de todas as pesquisas e trabalhos profissionais.

Resumo

BRITO, Risciela Salardi Alves de. **Produção e avaliação de compostos vegetais adsorvidos em adjuvantes para o desenvolvimento de novos insumos contra a otite externa canina.** 2023. 83f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A otite externa canina é um dos mais frequentes motivos de atendimento dermatológico dentro da medicina veterinária, e de difícil tratamento e apresenta muitos casos crônicos e recorrentes. O documento foi organizado em três artigos com os seguintes objetivos respectivamente: Avaliar a atividade antimicrobiana das soluções otológicas *in vitro*; Avaliar a eficiência no tratamento de cães com otite externa; Avaliar a atividade ceruminolítica *in vivo* e *in vitro*. Para todos estudos foram desenvolvidas e utilizadas três diferentes soluções otológicas: LCFO 1003 composta por extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e tris-edta; LCFO 1004 composta por extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e n-acetilcisteína; LCFO 1005 composta por *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, n-acetilcisteína e tris-edta e como grupo controle foi utilizado produto comercial a base de gentamicina, betametasona e clotrimazol. Artigo 1: O estudo de susceptibilidade antimicrobiana foi realizado por meio da técnica de disco-difusão, foram testadas 33 diferentes cepas bacterianas isoladas de cães com otite externa canina e para o teste frente a levedura *Malassezia pachydermatis* foram utilizados 30 isolados e foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo proposta no documento do CLSI M27A3. Os resultados demonstraram que as soluções otológicas LCFO 1004 e LCFO 1005, apresentaram halos de inibição similares a gentamicina frente a maioria das bactérias testadas principalmente do gênero *Staphylococcus*. Já para a levedura *M.pachydermatis* todos as soluções foram eficientes demonstrando baixos valores de MIC, assim como no teste frente a bactérias o produto LCFO 1005 demonstrou maior eficácia. Artigo 2- Para o estudo *in vivo* na espécie - alvo foram selecionados 64 cães com sinais clínicos de otite externa, os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o tratamento utilizado. Todos os animais foram tratados uma vez ao dia durante sete dias, sendo avaliados no dia "0"(D0), no dia 3 (D3) e no dia 7 (D7), quanto a presença de otalgia, prurido, odor, eritema e quantidade de cerúmen. Após a avaliação cada sinal clínico recebeu uma pontuação em score de 0 a 3, o qual 0 era considerado ausente e 3 a forma mais grave de aparecimento, a partir desta pontuação foi gerado um somatório por animal e por grupo durante cada dia de avaliação. No D0 e D7 foram coletadas amostras para cultura bacteriana, fúngica e citologia. Após os sete dias de tratamento, os compostos LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005, foram eficazes para a redução dos sinais clínicos e microrganismos

envolvidos em casos de otite externa canina, sendo similares ao controle. Artigo 3- Para avaliar a atividade de difusão foi produzido cerúmen artificial canino o qual foi depositado no corpo de seringas de 1mL e acrescido das soluções otológicas testes com o marcador Oil red. As quais foram armazenadas por 24 horas em banho maria e após foi mensurada a atividade de difusão de cada solução. Para o teste ceruminolítico 500mg do cerúmen foi depositado em tubos os quais foram acrescidos de 2mL das soluções otológicas, colocados em agitação por 20min, secagem durante 1 hora. Após foi realizada a pesagem para quantificar a perda de cerúmen, esse procedimento foi repetido por 5 vezes. O estudo demonstrou variabilidade dos produtos testados nas análises de difusão e ceruminolítica *in vitro*. A solução otológica LCFO 1004 se comportou mais próximo à solução comercial controle. Já no ensaio *in vivo*, foi possível observar a eficácia de todas as soluções otológicas na redução de exsudato, destacando-se a solução LCFO 1005 como a mais potente. Dessa forma, conclui-se que as soluções otológicas LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005 apresentam uma alternativa terapêutica eficiente para a inibição de patógenos óticos *in vitro* e apresentam efeito na redução de sinais clínico de otite externa em cães.

Palavras-chave: solução otológica; *Triticum aestivum*; *Bixa orellana*; Tris-edta; n-acetilcisteína

Abstract

BRITO, Risciela Salardi Alves de. **Production and evaluation of plant compounds adsorbed in adjuvants for the development of new inputs against canine otitis externa.** 2023. 83f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Canine external otitis is one of the most frequent reasons for dermatological care within veterinary medicine, and difficult to treat as many cases of recurrence and chronicles. In this context, the objective was to evaluate the efficiency of three otological solutions composed of plant extracts and adjuvants in the treatment of canine otitis externa. Three articles were carried out, with the following objectives respectively: Evaluate the antimicrobial activity of otological solutions in vitro; Evaluate the efficiency in the treatment of dogs with otitis externa; Evaluate ceruminolytic activity in vivo and in vitro. For all studies, three different otological solutions were developed and used: LCFO 1003 composed of ethanolic extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* and tris-edta; LCFO 1004 composed of ethanolic extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* and n-acetylcysteine; LCFO 1005 composed of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, n-acetylcysteine and tris-edta and as a control group a commercial product based on gentamicin, betamethasone and clotrimazole was used. Article 1: The study of antimicrobial susceptibility was carried out using the disk-diffusion technique, 33 different bacterial strains isolated from dogs with canine external otitis were tested and for the test against the yeast *M.pachydermatis*, 30 isolates were used and the technique microdilution in broth proposed in the CLSI document M27A3. The results showed that the otological solutions LFC0 1004 and LCFO 1005, presented inhibition halos similar to gentamicin against most of the bacteria tested, mainly from the genus *Staphylococcus*. As for the yeast *M.pachydermatis*, all solutions were efficient, demonstrating low MIC values, as well as in the test against bacteria, the LCFO 1005 product demonstrated greater effectiveness. Article 2- For the in vivo study on the target species, 64 dogs with clinical signs of external otitis were used, which were randomly divided into four groups according to the treatment used. All animals were treated once a day for seven days, being evaluated on day "0" (D0), on day 3 (D3) and on day 7 (D7), regarding the presence of otalgia, pruritus, odor, erythema and amount of cerumen. After the evaluation, each clinical sign received a score from 0 to 3, which 0 was considered absent and 3 the most severe form of appearance, from this score a sum was generated per animal and per group during each day of evaluation. On D0 and D7 samples were collected for bacterial and fungal culture and cytology. After seven days of treatment, the compounds LCFO 1003, LCFO 1004 and LCFO 1005 were effective in reducing clinical signs and microorganisms involved in cases of canine external otitis, being similar to the control. Article 3- To evaluate the diffusion activity, artificial canine cerumen was produced, which was deposited in the body of 1ml syringes and added to the otological test solutions with the Oil red marker. Which

were stored for 24 hours in a water bath and after that the diffusion activity of each solution was measured. For the ceruminolytic test, 500mg of cerumen was deposited in tubes which were added with 2ml of otological solutions, placed in agitation for 20min, drying for 1 hour. After weighing was carried out to quantify the loss of cerumen, this procedure was repeated 5 times. The study demonstrated variability of the products tested in the in vitro diffusion and ceruminolytic analyses. The LCFO 1004 otologic solution behaved closer to the commercial control solution. In the in vivo test, it was possible to observe the effectiveness of all otological solutions in reducing exudate, highlighting the LCFO 1005 solution as the most potent. Thus, it is concluded that the otological solutions LCFO 1003, LCFO 1004 and LCFO 1005 present an efficient therapeutic alternative for the inhibition of otic pathogens in vitro and have an effect on the reduction of clinical signs of external otitis in dogs.

Keywords: otological solution; *Triticum aestivum*; *Bixa orellana*; Tris-edta; n-acetylcysteine

Lista de Figuras

Artigo 1

- Figura 1 Cromatograma da amostra Extrato de Trigo – Amostra Sólida, sobreposição de cromatogramas do branco (linha rosa) e da amostra (linha preta)..... 28
- Figura 2 Cromatograma da amostra Extrato de Urucum – Padrões utilizados e picos encontrados..... 29

Artigo 2

- Figura 1 Demonstração do somatório dos sinais clínicos e diferenças estatísticas das análises clínicas realizadas dos cães tratados com os produtos LCFO 1003, LCFO 1004, LCFO 1005 e grupo controle. O símbolo (*) representa a diferença estatística entre os grupos avaliados..... 45
- Figura 2 Demonstração do somatório dos sinais clínicos a) Prurido, b) Eritema, c) Odor e d) Exsudato, dos grupos tratados com os produtos LCFO 1003, LCFO 1004, LCFO 1005 e grupo controle. As letras representam as diferenças estatísticas entre as coletas e o símbolo (*) representam a diferença estatística entre os grupos..... 46
- Figura 3 Demonstração dos isolamentos e resposta ao tratamento dos diferentes grupos teste e controle, frente a levedura *Malassezia pachydermatis* isoladas de cães com otite externa. O símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre o início (D0) e fim do tratamento (D7)..... 47

Figura 4	Demonstração dos isolamentos e resposta ao tratamento dos diferentes grupos teste e controle, frente a bactérias isoladas de cães com otite externa. O símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre o início e fim do tratamento.....	47
Figura 5	Demonstração da média de microrganismos cocos, bacilos e leveduras <i>Malassezia</i> sp., avaliados nas amostras citológicas de cães com otite externa canina, tratados com os produtos teste (LFCO 1003, 1004, 1005 e controle), o símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre as coletas.....	48
Figura 6	Demonstração da análise citológica semiquantitativa de cães com otite externa tratados com os grupos teste e grupo controle. As barras empilhadas demonstram o número de canais auditivos com diferentes pontuações.....	49

Artigo 3

Figura 1	Atividade ceruminolítica <i>in vitro</i> durante os períodos de tempo do teste.....	58
Figura 2	Aparência visual dos tubos contendo cerúmen artificial canino ao final do teste ceruminolítico, demonstrando o efeito de impregnação na parede dos tubos.....	59
Figura 3	Demonstração da atividade ceruminolítica <i>in vivo</i> dos produtos teste LFCO 1003, LFCO 1004, LFCO 1005 e Controle positivo em cães com sinais clínicos de otite externa.....	60

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Parâmetros de análise cromatográficas das amostras Diesel e JD..	26
Tabela 2	Demonstração dos halos de inibição frente a diferentes cepas bacterianas aos produtos teste 1003, 1004, 1005 e gentamicina.....	30
Tabela 3	Valores de CIM e CFM das soluções otológicas frente a <i>M. pachydermatis</i> obtidas pela técnica de microdiluição em caldo.....	32
Tabela 4	Valores de CIM 50 e CIM 90 das soluções otológicas 1003, 1004 e 1005.....	33
Tabela 5	Compostos majoritários do extrato etanoico de Urucum.....	35
Tabela 6	Compostos majoritários extrato etanoico de Trigo.....	35

Artigo 2

Tabela 1	Análise citológica semiquantitativa utilizada em cães com otite externa.....	44
----------	--	----

Artigo 3

Tabela 1	Quantificação da atividade de difusão nas soluções otológicas e grupo controle.....	58
----------	---	----

Lista de Abreviaturas e Siglas

Tris- ETDA	Hidroximetil-aminometano - Ácido Etileno Diamino Tetra Acético
LCFO 1003	Laboratório Clinpet Formulação Otológica 1003
LCFO 1004	Laboratório Clinpet Formulação Otológica 1004
LCFO 1005	Laboratório Clinpet Formulação Otológica 1005
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
MIC	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
PEG	Polietilenoglicol
BHT	Hidroxitolueno butilado
NIST	National Institute of Standards and Technology
ANOVA	Análise de Variância
DAPE	Dermatite Alérgica a Picada de Ectoparasitas
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
CEEA	Comitê de ética e experimentação animal
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas

Lista de Símbolos

°C	Graus Celsius
Mg	Miligramma
μL	Microlitros
μm	Micrometro
m	Metro
%	Por cento

Sumário

1 Introdução.....	14
2 Revisão da Literatura.....	16
3 Artigos.....	24
3.1 Artigo 1.....	24
3.2 Artigo 2.....	39
3.3 Artigo 3.....	52
4 Considerações Finais.....	64
Referências.....	65
Anexos.....	73

1 Introdução

A otite externa é uma afecção comum na clínica de pequenos animais, sendo a principal causa de atendimentos dermatológicos. É caracterizada por uma inflamação do conduto auditivo externo, considerada multifatorial e ligada a fatores predisponentes, primários e perpetuantes. Os principais sinais clínicos são otalgia, prurido, eritema e aumento da quantidade de cerúmen, podendo evoluir em casos crônicos para estenose, lesões proliferativas, hiperqueratose e hiperpigmentação (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007).

O diagnóstico é feito a partir de inspeção do conduto auditivo e otoscopia. Após é recomendado a realização de exames complementares como a citologia, cultura bacteriana e fúngica que são essenciais para diagnosticar os fatores envolvidos e células presentes, direcionando o tratamento de forma apropriada (HLINICA, 2017).

A conduta terapêutica é determinada a partir da avaliação clínica e exames complementares, porém atualmente os produtos comerciais apresentam um *pool* de fármacos antibacterianos, antifúngicos, anti-inflamatórios e anti-parasitários. Esses produtos têm por finalidade a redução dos sinais clínicos, sem considerar a causa e/ou o agente. Atualmente há uma preocupação em relação à resistência bacteriana pelo uso inadequado de antibióticos, já que o uso indiscriminado seleciona uma população de bactérias resistentes.

Os extratos vegetais das plantas urucum e trigo são conhecidos pela ação anti-inflamatória, cicatrizante e antimicrobiano. O extrato aquoso do *Triticum aestivum* já foi testado *in vivo* em cães por nosso grupo de pesquisa, o qual reduziu os sinais clínicos da otite externa, assim como reduziu o crescimento microbiano (FONTOURA, 2014). Em estudos prévios, nossas pesquisas também constataram que um composto fitoterápico composto pelos extratos de urucum e trigo, demonstrou eficiência *in vivo* no tratamento da otite externa, demonstrando eficiência estatisticamente semelhante a um ceruminolítico comercial (BRITO, 2019).

Tendo em vista a necessidade de novos produtos com menos efeitos deletérios, menor custo e redução da frequência, o trabalho teve como objetivo geral desenvolver três soluções otológicas para o tratamento de otite externa canina compostas por extratos vegetais de *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* associados a adjuvantes Tris-Edta e/ou N-acetilcisteína. Considerando os seguintes objetivos específicos determinar a eficiência das soluções otológicas LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005 na redução de sinais clínicos de otite externa; Determinar o potencial antimicrobiano destas soluções otológicas na redução de microrganismos envolvidos em casos de otite externa; Avaliar a susceptibilidade *in vitro* dos produtos frente a levedura *Malassezia pachydermatis* e bactérias isoladas em cães com sinais clínicos de otite externa; Avaliar a eficiência ceruminolítica *in vivo* e *in vitro* das soluções otológicas e Solicitar o depósito de patente Junto ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI).

2 Revisão da Literatura

2.1 Otite Externa Canina

A otite externa canina é caracterizada por uma inflamação do conduto externo, tendo prevalência entre 10-20% dos cães, apresenta causa multifatorial, estando relacionada a fatores predisponentes, causas primárias e fatores perpetuantes (COLE, 2009).

Os fatores predisponentes são conhecidos por facilitar a manifestação da otite, dentre eles são descritos a morfologia do conduto auditivo, traumas por limpeza, raças, presença de pelos, tratamentos anteriores e doenças sistêmicas (LOGAS, 1994; GOTTHELF, 2009). Os fatores primários são responsáveis pela origem da inflamação sendo as principais causas afecções dermatológicas, doenças endócrinas, otocaríase e corpos estranhos (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Já os fatores perpetuantes são descritos por piorarem a manifestação clínica e pelo insucesso na terapia, os principais fatores são a levedura *Malassezia pachydermatis*, bactérias cocos gram positivas *Staphylococcus intermedius* e *Staphylococcus aureus*, e os gram negativos *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. (KORBELIK et al., 2018).

2.1.1 Patogenia e Sinais Clínicos

No início do estabelecimento da otite externa canina ocorre um aumento das secreções ceruminosas que são mais aquosas e podem ajudar a controlar a proliferação bacteriana, durante a progressão da doença ocorre a hiperplasia das glândulas sebáceas e ceruminosas, reduzindo a movimentação do cerúmen pelo canal. A hiperplasia nodular, estenose das paredes do canal, permite um maior crescimento microbiano. A desordem no microclima auditivo resulta em um desequilíbrio onde as bactérias normalmente comensais como *S. pseudointermedius* e a levedura *Malassezia pachydermatis* aumentam o número tornando-se patológicas.

A infecção mista é comum inicialmente porém conforme o ouvido fica doente, tanto por intervenções de veterinários e tutores, quanto pela própria evolução da doença, bactérias resistentes a agentes bacterianos proliferam-se (HUANG et al., 2009). As bactérias mais frequentemente encontradas no conduto auditivo canino são *S. intermedius*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, espécies de *Corynebacterium*, *Enterococcus* e *Streptococcus* são relatadas (SHAW, 2016). A otite externa canina cursa com sinais clínicos agudos como eritema, exsudado, otalgia, odor e prurido, podendo evoluir para sinais crônicos como hiperqueratose, liquenificação, estenose e por vezes perda da audição (HLINICA, 2017).

2.1.2 Diagnóstico

O diagnóstico da otite externa canina é baseado na anamnese do paciente, sinais clínicos e exames complementares. A otoscopia é sempre realizada, devendo introduzir o otoscópio de maneira lenta e progressiva com o objetivo de visualizar sinais clínicos de eritema, erosões/ulceras, quantidade de cerúmen, alterações proliferativas e integridade da membrana timpânica (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). A citologia é um exame complementar essencial para estabelecer os fatores perpetuantes envolvidos e nortear o tratamento, é possível visualizar leveduras *Malassezia* spp., bactéria com morfologia cocos que tendem a ser gram positivas, bactérias com morfologia de bacilos que tendem a ser gram negativas e a presença de células inflamatórias (HENSEL, 2009). A cultura e antibiograma é um exame necessário em casos de otites purulentas e recidivantes indicadas para melhor conduzir o tratamento e evitar a seleção de cepas bacterianas resistentes (GRIFFIN, 2010). Exames complementares como radiografia e tomografia são indicados quando há suspeita de quadros de otite média e/ou interna. Durante a avaliação auditiva, deve-se sempre incluir um bom exame dermatológico visto que a grande maioria das vezes a otite cursa com uma doença dermatológica e base, deve-se buscar sinais clínicos como erosões, eritema, crostas, escoriações, alopecia, pápulas, pústulas e alterações crônicas como hiperqueratose e hiperpigmentação (HARVEY & PATERSON, 2014).

2.1.3 Tratamento

O tratamento da otite externa canina baseia-se na terapia tópica, embora o tratamento sistêmico com antibióticos e corticosteroides seja indicado em alguns casos. Para melhor alinhar o tratamento busca-se encontrar os fatores perpetuantes associados ao quadro, como leveduras e bactérias buscando dessa forma nortear o correto tratamento da afecção. Por vezes a cultura e o antibiograma se fazem necessários como em casos de otites purulentas, recidivantes e crônicas. O uso de corticoesteróides é muito benéfico quando utilizado por um curto período para auxiliar na redução da dor e inchaço, melhorando assim a adesão dos produtos de limpeza e tratamento, além disso podem auxiliar na inibição de biofilme bacteriano e prevenir o desenvolvimento de doenças crônicas. Tratamentos longos com glicocorticoides para o manejo de doenças não são encorajados, a menos que seja necessário (BAJWA, 2019). O tratamento pode incluir a remoção mecânica de detritos celulares e microrganismos através da limpeza auditiva, juntamente com antimicrobianos (PATERSON, 2016).

As taxas de resistência bacteriana vêm aumentando ao longo dos anos em animais de companhia e estudos vem sendo realizados afim de avaliar o comportamento de determinadas bactérias frente a seus correspondentes agentes terapêuticos. O uso inadequado de antimicrobianos de amplo espectro leva a resistência bacteriana envolvendo várias espécies e gerando problema na saúde única já que esses patógenos podem ser compartilhados entre animais e humanos (MARCONI, 2019).

O uso de compostos vegetais são opções para a substituição terapêutica por serem de fácil acesso, não causarem efeitos deletérios e não induzirem resistência. Além de ter o uso indicado para diferentes tipos de afecções apresentando por vezes equivalência terapêutica aos fármacos tradicionais (CAPELLA et al., 2016; FERNANDES et al., 2017).

2.2 Plantas Medicinais

O uso de princípios ativos oriundos de plantas são opções para a substituição terapêutica por serem produtos menos deletérios para a saúde do animal e não induzirem resistência. São compostos geralmente de fácil acesso e de baixo custo

que possuem comprovada eficiência antimicrobiana, anti-oxidativa e anti-inflamatória incentivando seu uso. (CAPELLA et al., 2016). Além do uso ser indicado para diferentes tipos de patologias, a utilização de extratos vegetais para tratamento de afecções otológicas vem sendo pesquisado e os resultados promissores ressaltam a equivalência terapêutica dos fármacos tradicionais como os fitoterápicos (FERNANDES et al., 2017).

Alguns óleos essenciais de plantas apresentam ação antifúngica e antibacteriana potentes, os óleos de tomilho e orégano, cravacol e timol, mostraram boa atividade antibacteriana e antifúngica frente a microrganismos isolados de cães com otite externa, incluindo isolados altamente resistentes a medicamentos alopáticos. Acredita-se que essa ação deve-se a presença de grande quantidade de compostos fenólicos presentes nesses óleos (SIM et al., 2019). A limpeza auditiva com extratos vegetais de Romã e prednisolona foi capaz de controlar os sinais clínicos bem como o crescimento de fungos e bactérias, demonstrando que casos leves de otite podem ser tratados somente com antissépticos e antiinflamatórios locais (PUIGDEMONT et al., 2021). Estudos anteriores recentes realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram eficiência de produtos otológicos compostos por extratos vegetais das plantas *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* na redução de sinais clínicos e população microbiana envolvida em casos de otite externa canina (BRITO et al., 2021).

2.2.1 Trigo (*Triticum aestivum*)

O trigo é uma gramínea anual e a espécie mais utilizada no Brasil é a *Triticum aestivum*, está entre as espécies vegetais mais importantes para alimentação humana, sendo utilizado no processo de panificação fazendo com que seja um cereal mundialmente conhecido (JOSHI et al., 2007; SCHEEREN et al., 2015).

É composto quimicamente por compostos fenólicos, flavonóides, cumarinas, terpeno, esteróis, saponinas e alcalóides (CURIMBABA, 2012). Possui assim diversas atividades farmacológicas destacando-se o efeito antiinflamatório, antioxidante e cicatricial (TILLMANN et al., 2014; CAPELLA et al., 2020).

O *Triticum* sp. possui propriedades que atuam na cicatrização de feridas, principalmente devido a presença de fitoestimulinas que agem sobre os fibroblastos. Estas exercem efeito mitogênico sobre os fibroblastos e estimulam a capacidade

fibroblástica de sintetizar fibras colágenas e glicosaminoglicana (SOLÓRZONO et al., 2001). O uso da planta vem sendo estudado pelo nosso grupo a muitos anos, a avaliação do uso na cicatrização de feridas em animais experimentais contendo diferentes concentrações de *Triticum vulgare*, demonstrou eficiência no tratamento de feridas *in vivo* (TILLMANN et al., 2018) outro estudo no tratamento de feridas em coelhos também demonstrou a eficiência na cicatrização principalmente devido a estimulação da força tensiométrica (TILLMANN et al., 2014).

Além da avaliação na cicatrização, também foi estudada a ação do extrato aquoso de *Triticum aestivum* na otite externa canina, demonstrando que após 14 dias de tratamento os cães apresentaram redução dos sinais clínicos e dos microrganismos isolados, tendo ação antimicrobiana e anti-inflamatória (FERNANDES et al., 2017).

A atividade antimicrobiana de *T. aestivum* é relatada frente a bactérias patogênicas, incluindo *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*. Estas ações confirmam que o *T. aestivum* possui compostos bioativos de importância medicinal apresentando um potencial significativo para ser utilizado na medicina tradicional como aliado ao tratamento de diversas doenças (RAJORIA et al., 2015).

2.2.2 Urucum (*Bixa Orellana*)

O urucum (*Bixa orellana* L.) pertence à família *Bixaceae* e foi uma das primeiras plantas cultivadas na floresta amazônica e desde então utilizada tradicionalmente devido a sua aplicação medicinal e pigmentar. Historicamente, o pigmento vermelho era utilizado pelos indígenas como ornamento e repelente de insetos e até hoje é utilizado como corante pela culinária e indústria alimentícia sendo uma opção natural frente aos corantes artificiais (CASTRO et al., 2009).

Na medicina popular, as sementes são utilizadas comumente como expectorantes na forma de xarope, ainda em forma de decocto são utilizadas para gargarejos, laxativas, antihemorragicas, cicatrizantes e contra dispepsia. As sementes secas na forma de decocção ou maceração são utilizadas nos males do fígado, tuberculose, afecções do coração, problemas de pele como antipirético e anti-inflamatório (MASUCCI, 1982; CAMARGO, 1988; RÊGO, 1995).

O urucum possui compostos bioativos fenólicos e carotenóides como a bixina e norbixina oriundos do metabolismo secundário das plantas e possui propriedades funcionais de uso medicinal, como a oxidação celular. Essa atividade antioxidante atua protegendo o organismo contra radicais livres agindo preventivamente a doenças cardiológicas, oncológicas e envelhecimento celular, por exemplo (MOREIRA et al., 2014).

Assim como o *Triticum aestivum*, o urucum já foi estudado em pesquisas anteriores por nosso grupo apresentando ação pró-inflamatória, acelerando o processo cicatricial com maior formação de crostas e epitelização em menor tempo, possivelmente devido aos ácidos linoleico e oleico que aceleram a retração de feridas (CAPELLA et al., 2016). Estudos com o extrato oleoso de urucum em feridas abertas de animais experimentais demonstrou que o extrato aumentou o processo cicatricial nos primeiros sete dias da cicatrização (CAPELLA et al., 2016).

O composto oriundo do extrato da *Bixa Orellana* apresenta propriedades pró inflamatórias com potencial comprovado pelo aumento da resposta cicatricial em feridas abertas (ZURAINI et al., 2007; YOKE et al., 2011; CAPELLA et al., 2016) além de ação antifúngica frente a *Candida Albicans* (POMA-CASTILLO et al., 2019) e *Aspergillus niger* (CASTELLO et al., 2002; GÓMEZ et al., 2012; CONRAD et al., 2013), e ação antimicrobiana frente a bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococos spp*, *Staphylococos aureus* (HUSSAIN et al., 2020), *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* *Bacillus cereus* e *Enterococcus durans* (GALINDO-CUSPINERA et al., 2002), ação analgésica (SHILPI, 2006). Contudo a polivalência medicinal natural do urucum o torna uma alternativa muito valiosa frente ao limitado número de fármacos disponíveis no mercado e também para combater a resistência bacteriana (MARCONI, 2019).

2.3 Adjuvantes no tratamento das otites externas

2.3.1 N-acetilcisteína

A n-acetilcisteína tem seu uso conhecido como antídoto para toxicidade ao acetaminofeno, além do uso como mucolítico e nefroprotetor. A medida que tem sido estudado seu mecanismo de ação, novas propriedades para seu uso tem sido descobertas. Essas propriedades são baseadas na eliminação de radicais livres da n-

acetilcisteína em momentos de estresse como inflamações, infecções e toxinas (CAVALCANTE & BRUIN, 2009; MIDDELVEEN & STRIEKER, 2016).

O uso da n-acetilcisteína é referenciado dentro da dermatologia, por atuar como antioxidante, possuir efeitos anti-inflamatórios, alterar os níveis de neurotransmissores, inibir a proliferação de fibroblastos e queratinócitos, e causar vasodilatação, por essas ações seu uso tem sido descrito em ictioses, dermatites de contato, dermatite atópica, melasma, pseudoporfiria, doenças do tecido conjuntivo, cicatrização de feridas e alopecia (JANECZEK et al., 2019).

Na otite externa a N-Acetilcisteína apresenta ação mucolítica e antimicrobiana, é relatado sua eficiência frente a bactérias comumente isoladas do conduto auditivo externo como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudointermedius*, *Corynebacterium* spp e *Streptococcus*, ainda é relatada a inibição de biofilmes bacterianos desenvolvidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* (MAY et al., 2016).

2.3.2 Tris- EDTA

O ácido etilenodiaminotetracético-trometamina (tris-EDTA) tem sido usado como componente em soluções otológicas para limpeza auditiva, o EDTA é um quelante que atua sobre cátions divalentes como o de Mg^{2+} ou Ca^{2+} , resultando em danos na membrana externa de bactérias gram negativas, já o TRIS é um tampão alcalino que auxilia o EDTA na quelação de cátions. A associação induz a liberação de lipopolissacarídeos e permite uma melhor penetração do agente antimicrobiano nas células bacterianas, aumentando assim sua ação (GRAY & WILKINSON, 1965; GOLDSCHMIDT & WYSS, 1967).

O Tris-EDTA aumenta a permeabilidade da bactéria gram-negativa e possui efeito positivo contra *P. aeruginosa* onde a sua utilização diminui a resistência microbiana às fluoroquinolonas e gentamicina, possibilitando a ação terapêutica desses fármacos (BOYD et al., 2019). Dessa forma, a utilização do Tris-EDTA se faz importante devido a multi resistência farmacológica adquirida pelas bactérias tornando o tratamento desses agentes um desafio (GBADAMOSIS & GOTTHELF, 2003).

A utilização tem sido associada a outros componentes como ao antisséptico clorexidina o qual promoveu maior susceptibilidade bacteriana e potencializou a clorexidina. Apresentou também sinergismo contra *E. coli* quando associada a

penicilina e a *P. vulgaris* associada a gentamicina (HEDLUND, 2007; FALANGA, 2009; PAVLETIC, 2010).

Outras associações também são relatadas como potencializadoras de cicatrização e analgesia em ferimentos e queimaduras (WOOLEY, 2015). TRIS-EDTA, clorexidine e n-acetilcisteína associados a ácido bórico ou láctico, segundo WIRTHERLE & ZOTTMAIER (2019) pode ser utilizado para tratar ou prevenir otites e dermatites através da dissolução de biofilmes bacterianos que estão presentes na pele e ouvidos.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Atividade antimicrobiana de compostos vegetais frente a microrganismos isolados de cães com otite externa

Risciela Salardi Alves de Brito; Márcia Kutscher Ripoll; Renata Costa Schramm;
Rogério António Freitag; Renato Vianna; Sergiane Baes Pereira; Sérgio Jorge;
Marcia de Oliveira Nobre

Será submetido à revista Archives of Veterinary Science

Atividade antimicrobiana de compostos vegetais frente a microrganismos isolados de cães com otite externa

Antimicrobial activity of plant compounds against microorganisms isolated from dogs with external otitis

RESUMO

Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana de três soluções otológicas contendo extratos vegetais e adjuvantes. Foram produzidas três diferentes soluções LCFO 1003 composto por extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e tris-edta, LCFO 1004 composto por extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e n-acetilcisteína, LCFO 1005 composto por *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, n-acetilcisteína e tris-edta e controle positivo. Foram testadas através da técnica de disco-difusão 33 diferentes cepas bacterianas isoladas de cães com otite externa canina. Para o teste frente a levedura *M. pachydermatis* foram utilizados 30 isolados e foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo proposta no documento do CLSI M27A3. Os resultados demonstraram que as soluções otológicas LCFO 1004 e LCFO 1005, apresentaram halos de inibição similares a gentamicina frente a maioria das bactérias testadas principalmente do gênero *Staphylococcus*. Já para a levedura *M. pachydermatis* todos as soluções foram eficientes demonstrando baixos valores de MIC, assim como no teste frente a bactérias o produto LCFO 1005 demonstrou maior eficácia. Concluiu-se que as soluções otológicas LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005 apresentaram ser uma alternativa terapêutica eficiente para a inibição dos patógenos avaliados.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*; *Bixa orellana*; N-acetilcisteína; Tris-edta; extratos vegetais

1. Introdução

A otite externa canina é uma afecção frequentemente encontrada na rotina clínica veterinária que causa sinais clínicos como odor, dor, eritema, exsudato e prurido. Dentre os microrganismos envolvidos mais comumente encontrados são a levedura *Malassezia pachydermatis*, bactérias cocos gram positivas *Staphylococcus pseudointermedius* e *Staphylococcus aureus*, e gram negativos *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp (Korbelik et al., 2018; Borriello et al., 2020).

Antimicrobianos orais e tópicos comumente têm sido utilizados para o tratamento da otite externa, frequentemente esses tratamentos têm se tornado ineficazes devido ao surgimento e à disseminação de patógenos resistentes a antimicrobianos. Esses microrganismos resistentes podem potencialmente ser um problema de saúde pública visto que pode ocorrer a transmissão no contato com humanos especialmente em indivíduos imunossuprimidos (Lozano-Navarro et al., 2017; Luján-Roca et al., 2017).

Dessa forma surge a necessidade de estudos e descoberta de novos agentes microbianos. O uso de produtos oriundos de plantas para a substituição ou potencialização terapêutica por serem produtos que causam menos efeitos adversos para a saúde do animal tornam-se uma opção promissora. São compostos geralmente de fácil acesso e de baixo custo que possuem comprovada eficiência antimicrobiana, anti-oxidativa e anti-inflamatória incentivando seu uso (Capella et al., 2016; Fernandes et al., 2017).

Os extratos de *Triticum aestivum* (Trigo) e *Bixa orellana* (Urucum) são conhecidos pela ação na cicatrização de feridas assim como na redução microbiana, além disso o extrato de *Triticum aestivum* demonstrou eficiência na melhora clínica de cães com otite externa, tornando uma possibilidade de utilização na formulação de produtos (Capella et al., 2016; Fernandes et al., 2017; Tillmann et al., 2018).

Os adjuvantes como o Tris-EDTA e a N-acetilcisteína são utilizados para aumentar a ação dos antimicrobianos e funcionam de diferentes maneiras agindo como inibidores de enzimas que inativam antibióticos, inibidores de bomba de efluxo, permeabilizadores de membrana bacteriana, dispersores de biofilme, elementos de resistência a antibióticos e vias fisiológicas celulares de inibidores de bactérias. Dessa forma as soluções otológicas testadas apresentam uma combinação dos extratos vegetais e adjuvantes com o objetivo da associação potencializar a ação frente aos microrganismos. Nesse contexto, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano de três soluções otológicas frente a diferentes microrganismos isolados de casos de otite externa canina

2. Materiais e Métodos

2.1. Obtenção das soluções otológicas

As amostras vegetais utilizadas para a formulação dos extratos foram adquiridas comercialmente de uma empresa distribuidora de produtos naturais, com certificação de origem das sementes e ficha técnica. Para formular o produto foram produzidos extratos etanólicos das plantas *Bixa orellana* e *Triticum aestivum*. As sementes foram pulverizadas em moinho de facas sendo pesadas e acondicionadas em um balão de Erlenmeyer e, adicionado Etanol PA ao balão e este levado ao ultrassom, sendo sonificado por 30 minutos. Ao final da extração os extratos foram filtrados em rotaevaporador para retirar o solvente. Após os extratos foram armazenados em frascos âmbar hermeticamente fechados e conservados a -4°C até sua utilização. Após a finalização os extratos foram utilizados para compor as formulações sendo a solução otológica LCFO 1003 composta por extratos etanólicos de urucum e trigo, TRIS-EDTA e aditivos (PEG 400, PEG 4000 e BHT), solução otológica LCFO 1004 composta por extrato etanólicos de urucum e trigo e N-Acetilcisteína (PEG 400, PEG 4000 e BHT) e a solução otológica LCFO 1005 composta por extratos etanólicos de urucum e trigo, Tris-edta, n-acetilcisteína e aditivos (PEG 400, PEG 4000 e BHT).

2.2. Análises cromatográficas

Para as análises cromatográficas dos extratos etanólicos de *Bixa orellana* e *Triticum aestivum* foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas com impacto eletrônico como modo de ionização e analisador quadrupolo, modelo Shimadzu GCMS-QP2010 SE, equipado com coluna Restek RTX-5MS (30 m x 0,25 µm), aproximadamente 30mg de cada uma das amostras de Extrato etanólico (ambas em estado sólido) foram dissolvidas em 1ml de acetonitrila grau HPLC. As soluções de trabalho foram obtidas a partir da diluição de 40 µL da solução estoque em 1ml de acetonitrila. Estas soluções foram analisadas por GC-MS utilizando-se os parâmetros de análise que estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros de análise das amostras Diesel e JD.

GC	Temperatura do injetor	280 °C
	Modo de injeção	Splitless
	Gás de arraste	Helio
	Fluxo do gás de arraste	1,10 mL.min ⁻¹
	Rampa de aquecimento	50 °C (2 min) – 5 °C/min – 250 °C (5 min)
MS	Temperatura da Interface	300 °C
	Temperatura da Fonte	250 °C
	Voltagem de ionização por EI	70 eV
	Modo de análise MS	SCAN (45 m/z – 500 m/z)

Os cromatogramas das amostras e os compostos foram identificados através de comparação do espectro de massas obtidas da biblioteca NIST.

2.3. Teste de susceptibilidade frente a leveduras *Malassezia pachydermatis*

Para este estudo foram obtidos 30 isolados de *M. pachydermatis* de cães com sinais clínicos de otite externa. As amostras foram semeadas em placas de Petri com Ágar Sabouraud acrescidas de cloranfenicol e incubadas em estufa microbiológica a 37°C durante 48 horas.

Para avaliação da atividade antifúngica foi utilizada a técnica de microdiluição de caldo presente no documento M27A3 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com adaptações para o uso em leveduras *M. pachydermatis* e fitofármacos (Eichenberg et al., 2003; Nascente., 2006; Santin et al., 2014).

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens com 48 horas de crescimento em ágar sabouraud acrescidos de cloranfenicol. As colônias foram suspensas em solução salina 0,9% e homogeneizadas em vórtex sendo ajustadas quanto à turbidez. A partir desta solução foi realizada uma diluição de 1:50 em solução salina e após uma diluição de 1:20 em caldo Sabouraud, a qual foi distribuído em alíquotas de 100µl nos poços das microplacas. Os produtos LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005 foram testados e duplicata nas concentrações de 100% a 3,12 % sendo diluídos em caldo Sabouraud.

Após o preenchimento as microplacas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas para a leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Em seguida foram transferidos 0,07µL de cada poço para placas de Petri contendo ágar sabouraud acrescidos de cloranfenicol, sendo posteriormente incubados a 37°C por 48 horas para a leitura da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

A leitura da CIM foi feita por método visual considerando a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento da levedura. Para determinação da CFM, também pelo método visual foi considerada a menor concentração do extrato que não permitiu o crescimento da levedura.

2.4. Teste de susceptibilidade frente a isolados bacterianos

Para o teste de susceptibilidade foram isoladas 33 bactérias obtidas de casos de otite externa canina, para a obtenção dos isolados as amostras foram semeadas em ágar sangue e em ágar MacConkey, após as amostras que apresentaram crescimento passaram por provas como catalase, peroxidase, coagulase e coloração de gram, após foram realizadas provas bioquímicas para identificar a espécie bacteriana. Foram testadas *Staphylococcus epidermidis* (n=8), *Staphylococcus aureus* (n=5), *Staphylococcus coagulase negativa* (n=5), *Staphylococcus intermedius* (n=2), *Staphylococcus sp.* (n=1), *Proteus sp.* (n=3), *Proteus sp.* + *Pseudomonas sp.* (n=1), *Corynebacterium sp* (n=3), *Enterobacter sp.* (n=1), *Escherichia coli* (n=1) e *Pseudomonas sp.* (n=3).

Para o teste foi utilizada a técnica de perfuração em ágar, o inóculo foi preparado a partir de colônias jovens com 24 horas de crescimento ajustadas a 0,5 na escala Macfarland, após foram semeadas placas com ágar Mueller Hinton e distribuídos anéis metálicos o quais foram preenchidos com 100µL das soluções otológicas e como controle foi utilizado gentamicina, após as amostras foram colocadas em estufa microbiológica a 25°C por 24 horas. A leitura foi realizada por método visual onde foi medido com régua o halo de inibição de cada solução testada.

2.5. Análise estatística

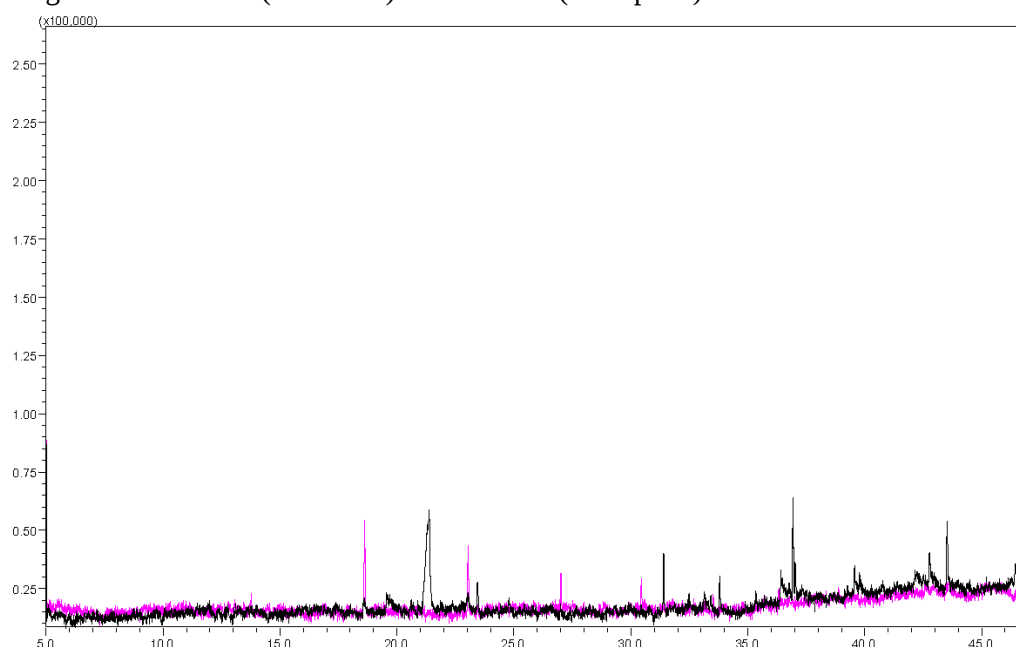
Para as análises estatísticas foi utilizado o pacote estatístico SPSS ® 20.0, considerando um nível mínimo de significância de 95%. Para a avaliação do teste de susceptibilidade a bactérias foi utilizada a análise de variância (ANOVA), sendo as médias e os halos comparados pelo teste de Tukey. Os dados

de susceptibilidade antifúngica foram relatados como intervalos MIC 50, os quais inibiram 50% das amostras e MIC 90, os quais inibiriam 90% das amostras. Para comparação entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-wallis.

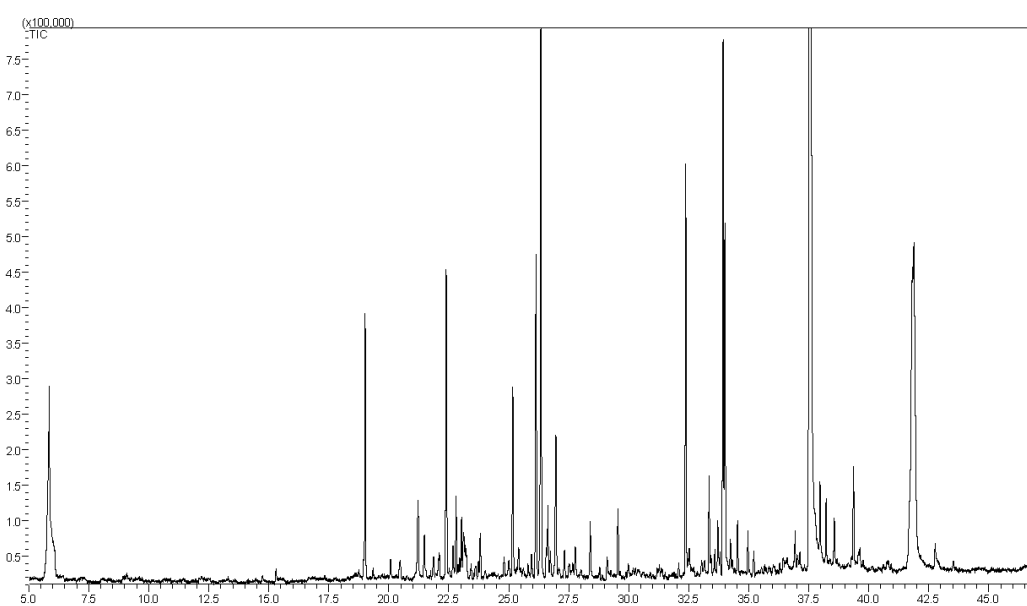
3. Resultados e Discussão

Na avaliação cromatográfica do extrato etanólico de trigo foram localizados 11 compostos majoritários (Figura 1), sendo a maior parte dos compostos da classe dos ácidos graxos (Tabela 2), já no extrato etanólico de urucum foram encontrados 59 compostos majoritários (Figura 2), sendo predominantemente terpenos e ácidos graxos (Tabela 3). Os ácidos graxos, tem inúmeras funções no organismo, atuando na barreira cutânea, hidratação, ação fungistática, além de ter ação na redução de prurido e podem modular a resposta inflamatória em condições como a dermatite atópica, já os terpenos são conhecidos por apresentarem atividade antifúngica, antiinflamatória e antioxidante (Stehle et al., 2010; Blaskovic et al., 2014; De Santiago et al., 2021).

Figura 1 - Cromatograma da amostra Extrato de Trigo – Amostra Sólida, sobreposição de cromatogramas do branco (linha rosa) e da amostra (linha preta).



136 **Figura 2** - Cromatograma da amostra Extrato de Urucum – Padrões utilizados e picos encontrados.



137

138 **Tabela 2** - Compostos majoritários do extrato etanoico de Urucum.

Extrato Etanolico de Urucum	Class	T.Retenção	P. mol (g/mol)	Similaridade	CAS
Xylene	Hd	5,86	106.16	98%	106-42-3
ethyl 4-oxo-2-pentenoate	Tri	9,08	128.13	84%	2833-24-1
3-Methylacetophenone	Cet	14,74	134.17	91%	585-74-0
Methyl m-methylbenzoate	Bez	15,31	150.7	95%	89-71-4
2-Isopropenyl-1-methyl-4-(1-methylethylidene)-1-vinylcyclohexane	Ses	18,76	204.35	89%	68845-33-0
3-Isopropenyl-1-isopropyl-4-methyl-4-vinyl-1-cyclohexene	Ter	19,02	204.35	94%	20307840
alpha.-Cubebene	Ter	19,35	204.35	93%	17699-14-8
Copaene	Ter	20,08	204.35	92%	3856-25-5
alpha.-Gurjunene	Ses	20,76	204.35	75%	489-40-7
gamma.-Cadinene	Ses	21,49	204.35	91%	1460-97-5
gamma.-Elemene	Hd	21,55	204.35	91%	515-13-9
(-)-Alloaromadendrene	Ses	21,75	204.35	87%	25246-27-9
gamma.-Gurjunene	Ses	21,87	204.35	90%	489-40-7
alpha.-Guaiene	Ses	22,39	204.35	89%	3691.12.1
alpha.-Bulnesene	Ses	22,52	204.35	78%	3691.11.0
gamma.-Muurolene	Ter	22,68	204.35	93%	30021-74-0
8-Isopropyl-1-methyl-5-methylene-1,6-cyclodecadiene	Hd	22,81	204.35	92%	37839-63-7
Caryophyllene-(I3)	Ses	22,89	204.357	81%	87-44-5
Cedrene	Ter	22,96	204,35	82%	469-61-4
delta.-Selinene	Ter	23,04	204.35	93%	28624-23-9
Eremophilene	Ses	23,12	204.35	95%	10219-75-7
Isoledene	Ses	23,44	204.35	77%	95910-36-4
gamma.-Muurolene	Ses	23,62	204.35	92%	30021-74-0
(-)-.alpha.-Panasinsen	Ses	23,74	204.35	88%	56633-28-4
delta.-Cadinene	Ses	23,81	204.35	92%	483-76-1
4-Isopropyl-1,6-dimethyl-1,2,3,4,4a,7-hexahydronaphthalene	Hd	24,05	204.35	72%	16728-99-7
beta.-Maaliene	Ses	24,81	204.35	91%	489-29-2

1,2-Ethanediol, 1,2-dimyrtenyl	Ter	25	302.45	74%	166389-92-0
Spathulenol	Ses	25,17	220.35	95%	6750-60-3
Guaiene	Ses	25,45	204.35	83%	88-84-6
alpha.-Gurjunene	Ses	25,5	204.35	79%	489-40-7
Selina-6-en-4-ol	Ses	26,14	222.37	89%	118173-08-3
Juniper camphor	Ses	26,97	222.37	87%	53840-55-4
Tricyclo[6.3.0.0(2,4)]undec-8-ene, 3,3,7,11-tetramethyl-	Ter	27,11	204.35	74%	405112-35-8
Viridiflorol	Ses	27,32	222.37	86%	552-02-3
beta.-Eudesmene	Ses	27,5	204.35	77%	17066-67-0
6-Isopropenyl-4,8a-dimethyl-1,2,3,5,6,7,8,8a-octahydro-naphthalen-2-ol	Ses	28,4	220.35	88%	726134-57-2
3-O-Acetyl-delta24-cycloartenol	Tri	32,08	426.72	81%	469-38-5
(6E,10E)-7,11,15-Trimethyl-3-methylene-1,6,10,14-hexadecatetraene	Ter	32,38	272.5	94%	70901-63-2
Pentacyclo[9.1.0.0(2,4).0(5,7).0(8,10)]dodecane, 3,3,6,6,9,9,12,12-octamethyl-, anti, syn, anti-	Ses	32,53	400.5	76%	106543-41-3
Lanceol, cis	Ses	33,03	220.35	77%	10067-28-4
n-Hexadecanoic acid	Grx	33,16	256.42	88%	57-10-3
(3E,6E,10E)-3,7,11,15-Tetramethyl-1,3,6,10,14-hexadecapentaene	Hd	33,35	272.5	97%	77898-97-6
Aromadendrene	Ses	33,43	204.35	81%	25246-27-9
delta.-Cadinene	Ses	33,72	204.35	73%	483-76-1
Ethyl palmitate	Grx	33,8	284.477	93%	628-97-7
Epiglobulol	Ses	34	222.37	87%	88728-58-9
(6E,10E)-3,7,11,15-Tetramethyl-1,6,10,14-hexadecatetraen-3-ol	Dit	34,54	290.5	96%	1113-21-9
Tricyclo[3.1.0.0(2,4)]hexane, 3,6-diethyl-3,6-dimethyl-, trans-	Ter	34,96	80.13	85%	NO
gamma.-Gurjunenepoxide-(2)	Fte	35,22	220.36	80%	22567-17-5
Ethyl (9E,12E)-9,12-octadecadienoate	Grx	36,94	308.5	93%	6114-21-2
Oleic acid, ethyl ester	Grx	37,03	310.51	82%	111-62-6
Geranylgeraniol	Dit	37,55	290.5	96%	7614-21-3
(2E,6E,10E)-3,7,11,15-Tetramethyl-2,6,10,14-hexadecatetraenyl acetate	Dit	38,56	318.49	80%	42207-88-5
trans, trans-Farnesyl acetate	Ter	39,37	264.408	94%	29548-30-9
2-(3,7-Dimethyl-octa-2,6-dienyl)-4-methoxy-phenol	Ter	41,87	260.37	74%	114067-41-3

139 Palmitic acid, beta.-monoglyceride Grx 42,79 330.5 88% 73299-28-2
 140 Compostos majoritários encontrados no extrato etanoico de Urucum. Hd: Hidrocarbonetos, Tri: Triterpenoides, Cet: Cetona, Bez: Benzenos, Ses: Sesquiterpenos, Ter: Terpenos, grx: Ácidos graxos, dit: Diterpenos, fte: Fitoesterol

141

142 **Tabela 3** - Compostos majoritários extrato etanoico de Trigo.

Composto	Classe	P. mol(g/mol)	Similaridade	CAS	T. Retenção
Sucrose	Fla	342.3	80%	57-50-1	21.38
n-Hexadecanoic acid	Grx	256.42	92%	57-10-3	33.15
Palmitic acid, ethyl ester	Grx	284.5	92%	628-97-7	33.80
Phthalic acid, di(2-methylbutyl) ester	Di	404.6	78%	88-99-3	35.35
Linoleic acid	Grx	280.44	86%	60-33-3	36.43
Ethyl linoleate	Grx	308.5	94%	544-35-4	36.94
Ethyl Oleate	Grx	310.51	87%	111-62-6	37.05
(3E)-6,6,7-Trimethyl-3-octene-2,5-dione	-	182.26	70%	5222-73-1	39.56
(9Z)-9,17-Octadecadienal	Ter	264.4	84%	56554-35-9	39.79
Palmitic acid .beta.-monoglyceride	Grx	330.5	82%	23470-00-0	42.77
Isooctyl phthalate	Org	390.6	96%	27554-26-3	43.55

143 Compostos majoritários do Extrato etanoico de Trigo. Grx: Ácido Graxo, Di: Ácido Dicarboxílico, Ter: Terpenos. Org: Compostos orgânicos, Fla: Flavorizantes

144

Para o teste de susceptibilidade, frente a bactérias, foram testadas 33 diferentes cepas bacterianas os quais apresentaram diferentes halos de inibição, os quais estão demonstrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Demonstração dos halos de inibição frente a diferentes cepas bacterianas aos produtos teste 1003, 1004, 1005 e gentamicina.

Cepa Bacteriana	1003 (mm)	1004 (mm)	1005 (mm)	Gentamicina (mm)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	25	30	31	48
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19	28	30	50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16	26	24	45
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	14	22	20	38
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11	22	21	33
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	20	22	37
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	26	28	32	47
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	13	22	29	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	13	21	23	44
<i>Staphylococcus aureus</i>	15	24	23	43
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	32	35	40
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	36	35	35
<i>Staphylococcus aureus</i>	S/Halo	12	17	25
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	17	18	17	40
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	13	14	17	33
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	16	21	20	31
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	11	22	23	30
<i>Staphylococcus coagulase negativa</i>	16	26	22	36
<i>Staphylococcus intermedius</i>	10	21	21	32
<i>Staphylococcus intermedius</i>	20	27	30	35
<i>Staphylococcus sp.</i>	14	23	23	30
<i>Proteus sp.</i>	S/Halo	15	12	36
<i>Proteus sp.</i>	S/Halo	20	15	47
<i>Proteus sp.</i>	S/Halo	S/Halo	12	33
<i>Proteus sp. + Pseudomonas sp.</i>	S/Halo	S/Halo	14	30
<i>Corynebacterium sp</i>	23	S/Halo	17	31
<i>Corynebacterium sp</i>	13	23	23	30
<i>Corynebacterium sp</i>	S/Halo	20	20	30
<i>Enterobacter sp</i>	S/Halo	9	S/Halo	30
<i>Escherichia coli</i>	S/Halo	11	13	27
<i>Pseudomonas sp</i>	S/Halo	14	17	43
<i>Pseudomonas sp</i>	S/Halo	S/Halo	S/Halo	27
<i>Pseudomonas sp</i>	S/Halo	S/Halo	S/Halo	31

Dentre as espécies testadas a grande maioria das bactérias não apresentaram diferença estatística entre os grupos teste e controle, demonstrando que os produtos foram tão efetivos quanto o grupo controle. Frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*, houve diferença estatística entre os grupos ($p=0,00$), LCFO 1003 e controle, ou seja, em comparação ao controle o grupo 1003, apresentou menor halo de inibição, já os demais grupos (LCFO 1004 e LCFO 1005), apresentaram eficiência equiparada ao grupo controle. A bactéria *Staphylococcus aureus* demonstrou resultado semelhante apresentando também

diferença estatística entre o grupo 1003 e controle ($p=0,02$), sendo o grupo 1003 com menor halo de inibição perante aos demais grupos. As cepas bacterianas de *Proteus* sp. demonstraram ser resistentes aos produtos testes apresentando inibição somente frente ao grupo controle.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são as mais frequentemente isoladas em casos de otite externa e na maioria das vezes são tratadas com fármacos alopáticos convencionais, fazendo com que seja estimulado o desenvolvimento de cepas resistentes, nossos produtos foram capazes de inibir o crescimento da maioria das cepas testadas, demonstrando bom halo de crescimento sendo similar ao grupo controle. A eficiência de óleos essenciais com atividades antibacterianas potentes como os óleos de tomilho e orégano, carvacrol e timol foi demonstrada em microrganismos isolados de otite externa em cães incluindo patógenos resistentes a medicamentos, acredita-se que ação se deve a presença de grande quantidade de compostos fenólicos presentes (Sim et al., 2019).

Em nosso estudo as formulações otológicas apresentaram atividade antibacteriana frente a diferentes cepas de bactérias *Staphylococcus*, os extratos metanólicos e etanólicos de *Triticum aestivum* também já demonstraram poder antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *E.coli* (Saha et al., 2018). Extratos de *Bixa orellana*, também apresentam ação antibacteriana frente a bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus aureus* (Hussain et al., 2020). Em nossa pesquisa somente o produto 1005 foi capaz de apresentar halo de inibição frente às bactérias gram negativas *Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp., isso ocorre possivelmente a essas bactérias serem mais virulentas, formadoras de biofilmes e a ocorrência de cepas resistentes (Pye, 2020; Kwon et al., 2022).

Os resultados das análises de microdiluição em caldo frente a *Malassezia pachydermatis*, destacam que todas soluções otológicas foram eficazes na inibição da levedura apresentando inibição de crescimento na maioria dos isolados testados, não havendo diferença estatística entre os produtos testados e o controle positivo. O produto 1005 apresentou menor valor numérico de CIM e CFM comparado aos demais grupos, porém na análise estatística através do teste de Kruskal-Wallis não houve diferença estatística entre os grupos analisados ($p>0,05$), os valores de CIM e CFM estão demonstrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de CIM e CFM das soluções otológicas frente a *M. pachydermatis* obtidas pela técnica de microdiluição em caldo.

Isolado	1003 (CIM) (mg/ml)	1004 (CIM) (mg/ml)	1005 (CIM) (mg/ml)	1003 (CFM) (mg/ml)	1004 (CFM) (mg/ml)	1005 (CFM) (mg/ml)
1	12,7	27	5,73	NI	6,75	5,73
2	12,7	27	5,73	102	6,75	11,4
3	12,7	6,75	11,4	NI	13,5	22,9
4	12,7	6,75	5,73	NI	6,75	45,8
5	12,7	3,37	5,73	NI	6,75	45,8
6	12,7	13,5	5,73	NI	13,5	22,9
7	25,5	13,5	5,73	NI	13,5	11,4
8	6,37	3,37	2,86	51	108	91,7
9	6,37	54	5,73	25,5	NI	45,8
10	3,18	6,75	2,86	25,5	54	22,9
11	3,18	6,75	2,86	25,5	6,75	11,4
12	12,7	13,5	2,86	NI	108	91,7
13	3,18	6,75	2,86	51	27	22,9
14	3,18	27	11,4	51	54	45,8
15	6,37	27	5,73	51	54	45,8
16	12,7	6,75	5,73	NI	NI	NI
17	12,7	27	2,86	102	54	45,8
18	102	108	22,9	NI	NI	NI
19	25,5	3,37	11,4	25,5	27	22,9
20	3,18	6,75	2,86	25,5	54	22,9
21	6,37	13,5	5,73	12,5	54	22,9
22	12,7	13,5	11,4	51	108	45,8
23	12,7	13,5	11,4	12,7	54	45,8
24	12,7	6,75	11,4	25,5	54	45,8
25	12,7	3,37	5,73	102	54	91,7
26	6,37	3,37	2,86	102	13,5	22,9
27	6,37	3,37	2,86	51	13,5	22,9
28	6,37	13,5	11,4	51	27	22,9
29	NI	13,5	11,4	NI	108	91,7
30	NI	27	22,9	NI	108	45,8

Os dados obtidos apresentam como intervalos MIC 50% (MIC50), ou seja, a quantidade necessária para inibir 50% das amostras e MIC 90% (MIC 90), quantidade para inibir 90% das amostras. Através da análise dos intervalos podemos perceber que o produto 1005, obteve melhores resultados que os demais, necessitando de uma menor quantidade para inibir as amostras testadas (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de CIM 50 e CIM 90 das soluções otológicas 1003, 1004 e 1005.

	1003	1004	1005
CIM 50%	12,7	13,5	5,73
CIM 90%	25,5	27	11,4

Assim como ocorre frente às bactérias os extratos vegetais de *Bixa orellana* que compõem nossos produtos, possui ação antifúngica relatada (Poma-Castillo et al., 2019). A boa atividade antifúngica dos nossos produtos pode ser justificável devido à alta concentração de terpenos encontradas em ambos os extratos etanólicos de urucum e trigo, outros compostos ricos em terpenos também demonstraram eficiência *in vitro* frente a leveduras do gênero *Malassezia* como descrito por Han et al. (2015) o qual encontrou uma concentração inibitória mínima de 0,63% (6,3mg/mL).

Outro fator que contribui para a atividade antimicrobiana é o uso dos adjuvantes N-acetilcisteína e TRIS-EDTA que funcionam de diferentes maneiras, atuando como inibidores de enzimas que inativam antibióticos, inibidores de bomba de efluxo, permeabilizadores de membrana, dispersores de biofilmes, inibidores de elementos de resistência a antibióticos e inibidores de bactérias por vias fisiológicas celulares. O uso dos adjuvantes TRIS-EDTA, EDTA dissódico e N-Acetilcisteína foram eficientes para cepas de patógenos óticos como *Malassezia pachydermatis*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *B-hemolítico*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis* (Chan et al., 2019).

O TRIS-EDTA já foi testado em associação com outros compostos vegetais, frente a microrganismos isolados de casos de otite externa canina os óleos de canela e cinamaldeído, foram associados ao TRIS-EDTA apresentando eficiência a patógenos comuns relacionados a otite, como a levedura *Malassezia pachydermatis* e cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Sim et al., 2019), Em nosso estudo percebemos uma maior atividade dos produtos que apresentam N-acetilcisteína (1004 e 1005) em comparação ao produto 1003 que contém somente o TRIS-EDTA. A N-acetilcisteína apresenta ação mucolítica e antimicrobiana, além de ser capaz de romper biofilmes bacterianos. Seu uso como antimicrobiano, foi comprovado *in vitro* frente a bactérias *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp. e *Streptococcus* spp., obtendo resultados promissores (May et al., 2016), seu uso associado a compostos vegetais não foi encontrado na literatura.

4. Conclusão

Os resultados obtidos indicaram que as três soluções otológicas estudadas LCFO 1003 (Extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e Tris-edta) LCFO 1004 (Extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e n-acetilcisteína) e LCFO 1005 (Extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* Tris-edta e n-acetilcisteína) foram uma alternativa terapêutica eficiente para a inibição de microrganismos envolvidos em casos de otite externa, em especial a solução LCFO 1005 que apresentou maior eficiência nos testes realizados.

5. Referencias

- Blaskovic M, Rosenkrantz W, Neuber A, Sauter-Louis C, Mueller RS. The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Journal*, 199(1):39-43, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.024>
- Borriello G, Paradiso R, Catozzi C, Brunetti R, Roccabianca P, Riccardi MG, Cecere B, Lecchi C, Fusco G, Cecilian F, Galiero G. Cerumen microbial community shifts between healthy and otitis affected dogs. *PLoS One*, 15(11):e0241447, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241447>
- Capella S, Tillmann MT, Félix AOC, Fontoura EG, Fernandes CG, Freitag RA, Santos MAZ, Félix SR, Nobre MO. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 68(1):104-112, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8374>

- 232 Chan WY, Khazandi M, Hickey EE, Page SW, Trott DJ, Hill PB. In vitro antimicrobial activity of seven
233 adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. *Veterinary Dermatology*,
234 30(2):133-138, 2019. <https://doi.org/10.1111/vde.12712>
- 235 De Santiago MS, Arribas JLG, Llamas YM, Becvarova I, Meyer H. Randomized, double-blind, placebo-
236 controlled clinical trial measuring the effect of a dietetic food on dermatologic scoring and pruritus in
237 dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research*, 17(1):1-8, 2021.
238 <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03063-w>
- 239 Eichenberg M L, Appelt CE, Berg V, Muschner, AC, Nobre MO, Matta D, Alves SH, Ferreira L.
240 Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth
241 microdilution method. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2(31):75-80, 2003. [https://doi.org/10.22456/1679-](https://doi.org/10.22456/1679-9216.17072)
242 9216.17072
- 243 Fernandes C, Hijano A, Lima C, Fontoura EG, Schramm RC, Félix SR, Nobre MO. A randomized,
244 double blind, placebo-controlled study to assess the effect of an aqueous extract of *Triticum aestivum*
245 on canine outer ear inflammation. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 11(37):1270-1274, 2017.
246 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100012>
- 247 Han J I, Park SJ, Kim, SG, Park HM. Antimicrobial effects of topical skin cream containing natural oil
248 mixtures against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Malassezia pachydermatis*. *Veterinari*
249 *Medicina*, 60(4):202-207, 2015. <https://agriculturejournals.cz/pdfs/vet/2015/04/05.pdf>
- 250 Hussain MS, Singh M, Kumar B, Tewari D, Mansoor S, Ganesh N. Antimicrobial activity in ethanolic
251 extracts of *Bixa orellana* L., *Simarouba glauca* DC and *Ocimum tenuiflorum* L. collected from JNCH
252 herbal garden. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4):650-663, 2020.
253 [https://www.researchgate.net/publication/344047477_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_IN_ETHANO](https://www.researchgate.net/publication/344047477_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_IN_ETHANOLIC_EXTRACTS_OF_BIXA_ORELLANA_L_SIMAROUBA_GLAUCA_DC_AND_OCIMUM_TENUIFLORUM_L_COLLECTED_FROM_JNCH_HERBAL_GARDEN)
254 [LIC_EXTRACTS_OF_BIXA_ORELLANA_L_SIMAROUBA_GLAUCA_DC_AND_OCIMUM_TE](https://www.researchgate.net/publication/344047477_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_IN_ETHANOLIC_EXTRACTS_OF_BIXA_ORELLANA_L_SIMAROUBA_GLAUCA_DC_AND_OCIMUM_TENUIFLORUM_L_COLLECTED_FROM_JNCH_HERBAL_GARDEN)
255 [NUIFLORUM_L_COLLECTED_FROM_JNCH_HERBAL_GARDEN](https://www.researchgate.net/publication/344047477_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_IN_ETHANOLIC_EXTRACTS_OF_BIXA_ORELLANA_L_SIMAROUBA_GLAUCA_DC_AND_OCIMUM_TENUIFLORUM_L_COLLECTED_FROM_JNCH_HERBAL_GARDEN)
- 256 Korbelik J, Singh A, Rousseau J, Weese JS. Analysis of the otic mycobiota in dogs with otitis externa
257 compared to healthy individuals. *Veterinary Dermatology*, 29(5):417:138, 2018.
258 <https://doi.org/10.1111/vde.12665>
- 259 Kwon J, Yang MH, Ko HJ, Kim SG, Park C, Park SC. Antimicrobial resistance and virulence factors of
260 *Proteus mirabilis* isolated from dog with chronic otitis externa. *Pathogens*, 11(10):1215, 2022.
261 <https://doi.org/10.3390/pathogens11101215>
- 262 Lozano-Navarro JI, Díaz-Zavala NP, Velasco-Santos C, Martínez-Hernández AL, Tijerina-Ramos BI,
263 García-Hernández M, Rivera-Armenta JL, Páramo-García U, Reyes-de la Torre AI. Antimicrobial,
264 optical and mechanical properties of chitosan–starch films with natural extracts. *International Journal*
265 *of Molecular Sciences*, 18(5):997, 2017. <https://doi.org/10.3390/ijms18050997>
- 266 Luján-Roca DÁ, Saavedra-Espinoza L, Luján-Roca LM. (2017). Antibiotic resistance of pathogenic
267 bacteria isolated from dogs at a veterinary clinic in Callao, Peru. *REDVET. Revista Electrónica de*
268 *Veterinaria*, 18(9):1-7, 2017.
269 [https://www.researchgate.net/publication/320025017_Antibiotic_resistance_of_pathogenic_bacteria_i](https://www.researchgate.net/publication/320025017_Antibiotic_resistance_of_pathogenic_bacteria_isolated_from_dogs_at_a_veterinary_clinic_in_Callao_Peru)
270 [solated_from_dogs_at_a_veterinary_clinic_in_Callao_Peru](https://www.researchgate.net/publication/320025017_Antibiotic_resistance_of_pathogenic_bacteria_isolated_from_dogs_at_a_veterinary_clinic_in_Callao_Peru)
- 271 May ER, Conklin K A, Bemis D A. Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine otitis
272 externa isolates. *Veterinary Dermatology*, 27(3):188-e47, 2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12313>

- 273 Nascente PS. Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da
 274 sensibilidade in vitro e in vivo frente a antifúngico. 2006. 135f. Tese (Doutorado em Ciências
 275 Veterinárias), Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre,
 276 2006.
- 277 Poma-Castillo L, Espinoza-Poma M, Mauricio F. Antifungal activity of ethanol-extracted *Bixa orellana*
 278 (L)(Achiote) on *Candida albicans*, at six different concentrations. The Journal of Contemporary Dental
 279 Practice, 20(10):1159-1163, 2019. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883250/>
- 280 Pye C. *Pseudomonas* otitis externa in dogs. The Canadian Veterinary Journal, 59(11):1231, 2018.
 281 [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190182/#:~:text=Dogs%20presenting%20with%20P](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190182/#:~:text=Dogs%20presenting%20with%20Pseudomonas%20otitis,from%20the%20ear%20canal%2C%20aural)
 282 [seudomonas%20otitis,from%20the%20ear%20canal%2C%20aural](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6190182/#:~:text=Dogs%20presenting%20with%20Pseudomonas%20otitis,from%20the%20ear%20canal%2C%20aural)
- 283 Saha S, Zohorul I, Sadequi I, Shahadat I, Shahinul I. Evaluation of antimicrobial activity of wheat
 284 (*Triticum aestivum* L.) against four bacterial strains. SKUAST Journal of Research, 20(1):58-62, 2018.
 285 [https://www.researchgate.net/publication/326263956_Evaluation_of_antimicrobial_activity_of_wheat](https://www.researchgate.net/publication/326263956_Evaluation_of_antimicrobial_activity_of_wheat_Triticum_aestivum_L_against_four_bacterial_strains)
 286 [_Triticum_aestivum_L_against_four_bacterial_strains](https://www.researchgate.net/publication/326263956_Evaluation_of_antimicrobial_activity_of_wheat_Triticum_aestivum_L_against_four_bacterial_strains)
- 287 Santin R, Giordani C, Madrid IM, Matos CB, Freitag RA, Meireles MCA, Cleff MB, Mello JRB.
 288 Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*.
 289 Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 66(2):367-373, 2014.
 290 <http://dx.doi.org/10.1590/1678-41626476>
- 291 Sim JXF, Khazandi M, Pi H, Venter H, Trott DJ, Deo P. Antimicrobial effects of cinnamon essential oil
 292 and cinnamaldehyde combined with EDTA against canine otitis externa pathogens. Journal of applied
 293 Microbiology, 127(1):99-108, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14298>
- 294 Stehle ME, Hanczaruk M, Schwarz SC, Göbel TW, Mueller RS. Effects of polyunsaturated fatty acids
 295 on isolated canine peripheral blood mononuclear cells and cytokine expression (IL-4, IFN- γ , TGF- β) in
 296 healthy and atopic dogs. Veterinary Dermatology, 21(1):113-118, 2010. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00860.x)
 297 [3164.2009.00860.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00860.x)
- 298 Tillmann MT, Mendes CBM, Fischer G, Júnior ASV, Fernandes CG, Nobre MO. *Triticum aestivum* in
 299 open skin wounds: cytotoxicity and collagen histopathology. Semina: Ciências Agrárias, 39(4):1547-
 300 1554, 2018.
 301 [https://www.researchgate.net/publication/327168598_Triticum_aestivum_in_open_skin_wounds_Cyt](https://www.researchgate.net/publication/327168598_Triticum_aestivum_in_open_skin_wounds_Cytotoxicity_and_collagen_histopathology)
 302 [otoxicity_and_collagen_histopathology](https://www.researchgate.net/publication/327168598_Triticum_aestivum_in_open_skin_wounds_Cytotoxicity_and_collagen_histopathology)

3.2 Artigo 2

Potencial terapêutico de formulações otológicas compostas por ativos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, Tris-edta e N-acetilcisteína no tratamento de otite externa canina

Risciela Salardi Alves de Brito; Antônio Gonçalves de Andrade Júnior; Rogério Antônio Freitag; Renato Vianna; Fábio Raphael da Costa Brumm; Sérgio Jorge; Marcia de Oliveira Nobre

Será submetido à revista Ciência Animal Brasileira

Potencial terapêutico de formulações otológicas compostas por ativos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, Tris-edta e N-acetilcisteína no tratamento de otite externa canina

Therapeutic potential of otological formulations composed of actives from *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, Tris-edta and N-acetylcysteine in the treatment of canine otitis externa

Resumo

Objetivou-se avaliar a eficiência de três soluções otológicas a base de extratos vegetais e adjuvantes no tratamento da otite externa canina. Foram desenvolvidas três diferentes soluções otológicas LCFO 1003 composta por extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e tris-edta, LCFO 1004 composta por extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e n-acetilcisteína, LCFO 1005 composta por *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, n-acetilcisteína e tris-edta, como grupo controle foi utilizado produto comercial a base de gentamicina, betametasona e clotrimazol. Para o estudo foram selecionados 64 cães com sinais clínicos de otite externa, os quais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de acordo com o tratamento utilizado, todos os animais foram tratados uma vez ao dia durante sete dias, sendo avaliados durante três momentos (D0, D3 e D7), durante as avaliações foram considerados os sinais clínicos de otalgia, prurido, odor, eritema e quantidade de cerúmen, posteriormente foram coletadas amostras para cultura bacteriana, fúngica e citologia nos momentos D0 (antes do tratamento) e D7 (após o tratamento). Após a avaliação cada sinal clínico recebeu uma pontuação em escore de 0 a 3, o qual 0 era considerado ausente e 3 a forma mais grave de aparecimento, a partir desta pontuação foi gerado um somatório por animal e por grupo durante cada dia de avaliação. Após os sete dias de tratamento, os compostos LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005, foram eficazes para a redução dos sinais clínicos e microrganismos envolvidos em casos de otite externa canina.

Palavras-chaves: extratos vegetais; otopatia; adjuvantes; trigo; urucum

Abstract

The objective was to evaluate the efficiency of three otological solutions based on plant extracts and adjuvants in the treatment of canine otitis externa. Three different ear solutions were developed: LCFO 1003 composed of ethanolic extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* and tris-edta, LCFO 1004 composed of ethanolic extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* and n-acetylcysteine, LCFO 1005 composed of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, n-acetylcysteine and tris-edta, as a control group a commercial product based on gentamicin, betamethasone and clotrimazole was used. For the study, 64 dogs with clinical signs of external otitis were used, which were randomly divided into four groups according to the treatment used, all animals were treated once a day for seven days, being evaluated during three moments (D0, D3 and D7), during the estimates, clinical signs of otalgia, pruritus, odor, erythema and amount of cerumen were evaluated, later samples were collected for bacterial and fungal culture and cytology at moments D0 and D7. After the evaluation, each clinical sign received a score from 0 to 3, which 0 was considered absent and 3 the most severe form of manifestation, from this evaluation a sum was generated per animal and per group during each evaluation day. The results were analyzed through statistical tests. After seven days of treatment, the compounds LCFO 1003, LCFO 1004 and LCFO 1005 were effective in reducing clinical signs and microorganisms involved in cases of canine external otitis.

Keywords: plant extracts; otopathy; adjuvants; wheat; annatto

1. Introdução

As otites externas em cães podem se apresentar como crônicas e recidivantes. Muitas vezes a fase inicial da otite, com sinais clínicos mais brandos, pode passar despercebida pelo tutor, o que determina a progressão e evolução da doença. A terapia tópica é a mais indicada e a mais utilizada nos quadros de otite externa. Nesse sentido é difícil encontrar produtos dentro do mercado veterinário que não sejam uma associação de antibióticos, antifúngicos e glicocorticóides, dificultando a escolha com base em análises citológicas e clínicas, obrigando a utilização dessa combinação de compostos mesmo quando seu uso é desnecessário estimulando assim a resistência microbiana e o uso desnecessário de glicocorticóides¹.

O tratamento tópico frequente com o uso de antibióticos tem gerado preocupação devido aos casos frequentes de resistência bacteriana de diversas cepas comumente isoladas de pacientes caninos com otite externa. O uso prudente de antimicrobianos é importante do ponto de vista da saúde pública, considerando que bactérias ou genes de resistência podem ser transmitidos a humanos².

A otite externa canina é considerada uma das principais afecções dentro da dermatologia veterinária, sendo caracterizada pela inflamação do conduto auditivo externo, ocasionando sinais clínicos agudos como otalgia, odor, eritema, prurido e otorréia, podendo evoluir para manifestações crônicas como hiperqueratose, hiperpigmentação e estenose³. Possui origem multifatorial, apresentando fatores predisponentes, primários e perpetuantes. Os fatores predisponentes são responsáveis por aumentar a predisposição em desenvolver o quadro, como a raça, condutos auditivos com presença de pelos, morfologia pendular e distribuição de glândulas sebáceas. Os fatores primários são responsáveis por efetivamente causar a otite, dentre as causas mais frequentes encontram-se doenças alérgicas, como a atopia, alergia alimentar e Dermatite Alérgica a Picada de Ectoparasitas (DAPE), doenças endócrinas e doenças imunomediadas. Os fatores perpetuantes são responsáveis pela severidade do quadro e o insucesso na terapia dentre eles os mais frequentes são a levedura *Malassezia pachydermatis*, bactérias cocos gram positivas como *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* e gram negativas como *Pseudomonas* spp e *Proteus* spp.⁴

Tendo em vista a prevenção da resistência microbiana, buscam-se alternativas para evitar o uso de antibióticos e antifúngicos convencionais em casos leves e/ou iniciais de otite externa. Nesse contexto esse trabalho objetivou avaliar o efeito de três soluções otológicas com extratos vegetais e adjuvantes (Tris-EDTA e/ou N-acetilcisteína) no tratamento de casos clínicos de otite externa canina, naturalmente adquirida.

2. Metodologia

2.1. Obtenção dos extratos vegetais

Para a elaboração dos produtos foram utilizados os extratos etanólicos das plantas *Bixa orellana* (Urucum) e *Triticum aestivum* (Trigo). As sementes das plantas foram obtidas comercialmente, de uma empresa distribuidora de produtos naturais. Posteriormente, foram trituradas e pesadas, sendo acondicionadas em um balão de Erlenmeyer, junto da adição de Etanol PA ao balão. Logo depois, a mistura foi filtrada e levada ao ultrassom sendo sonificada por 30 minutos. Ao final da extração o balão foi levado ao rotaevaporador para remoção do solvente, depois, o extrato foi armazenado em frasco âmbar até sua utilização.

2.2. Formulação das soluções otológicas

As soluções otológicas foram preparadas a partir dos extratos etanólicos de urucum e trigo, sendo a primeira solução denominada 1003, composta pelos extratos etanólicos acrescidas de TRIS-EDTA, PEG 400 e PEG 4000, a segunda denominada 1004, composta pelos mesmos extratos etanólicos N-Acetilcisteína, PEG 400 e PEG 4000. A última solução 1005, composta pelos extratos etanólicos acrescidos da combinação de TRIS-EDTA, N-acetilcisteína, PEG 400 e PEG 4000. Os produtos estão em processo de reivindicação de patente com depósito no INPI.

2.3. Estudo em cães com otite naturalmente desenvolvida

Para o experimento foram selecionados 64 cães e para a inclusão no estudo foram analisados a presença de pelo menos três dos seguintes sinais clínicos compatíveis com otite externa canina: eritema, exsudato, prurido, otalgia, edema, odor e erosão/úlceras. Foram excluídos do estudo fêmeas prenhes e cães com presença de nódulos ou massas no do conduto auditivo. Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética para Experimentação Animal (CEEA 23110.051174/2019.15).

Para o tratamento os cães foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, Grupo 1003 (Extratos etanólicos de urucum, trigo e TRIS-EDTA), Grupo 1004 (Extratos etanólicos de urucum, trigo e N-Acetilcisteína), Grupo 1005 (Extratos etanólicos de urucum e trigo, TRIS-EDTA e N-acetilcisteína) e Grupo Controle positivo, produto comercial a base de clotrimazol, sulfato de gentamicina e valerato de betametasona. Os animais foram tratados uma vez a cada 24 horas, durante 7 dias, primeiramente a orelha e a parte externa do conduto auditivo foi higienizada com auxílio de gaze com o respectivo tratamento. Após foi instilado no conduto

auditivo o respectivo produto na seguinte dosagem: 4 gotas para o tratamento de cães com menos de 15 kg e 8 gotas para cães com mais de 15 kg.

Os animais foram avaliados nos dias 0,3 e 7 de tratamento pelo mesmo avaliador, através da inspeção do conduto auditivo e videotoscopia considerando os sinais clínicos (eritema, exsudato, otalgia, odor, prurido, edema, erosão/úlceras). Cada sinal clínico avaliado recebeu uma pontuação de 0 a 3. Considerando zero como ausente, 1 como leve, 2 como moderado e 3 como intenso. Já os sinais de erosão/úlceras por serem sintomas mais graves, foram classificados como ausente (0) ou presente (2). Após a avaliação de cada cão, foi realizado um somatório dos sinais clínicos por grupo para a comparação estatística. Antes (dia 0) e após (dia 7) o tratamento, foram coletadas amostras com *swab* estéril introduzido na porção vertical do conduto auditivo externo, para cultura bacteriana, cultura fúngica e análise citológica. Para as culturas bacterianas e fúngicas os *swabs* foram acomodados em tubos com meio de transporte Stuart e encaminhados até o laboratório para cultura e identificação.

2.4. Análise citológica

Para análise citológica os *swabs* contendo as amostras de cerúmen foram rolados em lâmina de vidro e corados com panótico rápido e posteriormente analisado em microscópio em aumento de 1000x. Para a leitura dessas lâminas foram considerados 5 campos microscópicos e quantificadas a presença de cocos, bacilos e da levedura *M. pachydermatis*. Ao final da contagem foi realizada a média dos 5 campos analisados em cada lâmina avaliada. Também foi utilizada uma escala citológica semiquantitativa de acordo com Budach & Mueller (2012)⁵ descrita na tabela 1, para a avaliação de microrganismos e células inflamatórias presentes, sendo classificados em uma escala de 0 a 4 de acordo com a quantidade visualizada.

Tabela 1. Análise citológica semiquantitativa utilizada em cães com otite externa

Classificação	Descrição
0	Sem bactérias/leveduras/células inflamatórias
1	Bactérias/leveduras/células inflamatórias presentes ocasionalmente
2	Menos de 5 microrganismos por campo
3	5-50 microrganismos por campo
4	Mais de 50 microrganismos por campo

2.5. Atividade antimicrobiana

Para a cultura fúngica, as amostras foram semeadas em placas de ágar Sabouraud acrescidas de cloranfenicol, armazenadas em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas, e em seguida feita a citologia das colônias que cresceram. Para o isolamento bacteriano, as amostras foram semeadas em ágar sangue e ágar MacConkey, e armazenadas em estufa microbiológica a 25°C. Por fim, foi realizada coloração de Gram das colônias que cresceram, provas de catalase, coagulase e peroxidase, e também provas bioquímicas de acordo com a necessidade, para a identificação de cada microrganismo.

2.6. Análise estatística

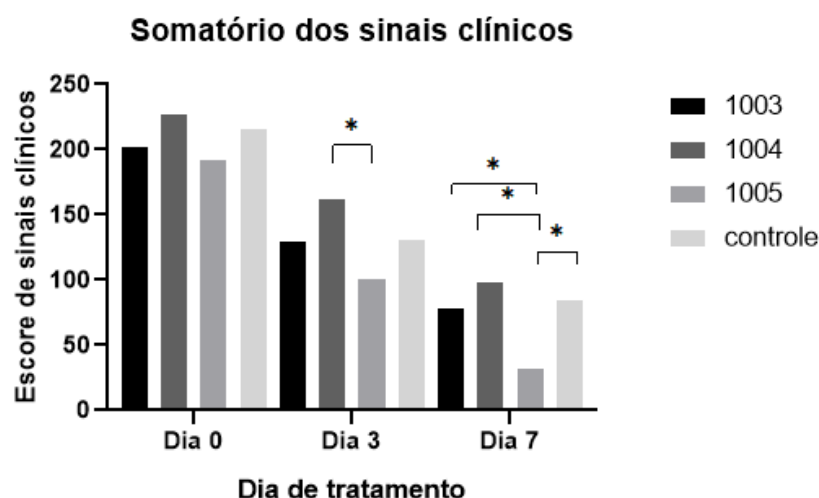
Para as análises estatísticas foi utilizado o pacote estatístico SPSS ® 20.0, considerando um nível mínimo de significância de 95%. Todos os grupos foram comparados entre si utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Para a comparação entre os dias de coleta foi utilizado o teste de Friedman. Para as culturas microbiológicas foi utilizado o teste de McNemar para a comparação entre as coletas e o teste de Qui-quadrado para a comparação entre os grupos. A citologia foi comparada entre as coletas através do teste de Wilcoxon e entre os grupos pelo teste de Kruskal-wallis.

3. Resultados e Discussões

Os resultados nos indicaram que o produto 1005 apresentou melhor eficácia que os demais na redução dos sinais clínicos de otite externa, conforme detalhado a seguir.

No teste de Kruskal-wallis todos os grupos apresentaram melhora em relação a intensidade dos sinais clínicos. Entretanto, o grupo tratado com o produto LCF0 1005, foi o que mais reduziu os sinais clínicos ao fim do tratamento, apresentando diferença estatística ($p=0,03$) dos demais grupos. Através do teste de Friedman foi possível avaliar que todos os grupos

165 apresentaram diferença estatística ($p=0,00$) entre o início e o fim do período experimental,
 166 demonstrando que todos os animais tratados melhoraram durante o tratamento (Figura 1).



167
 168 **Figura 1.** Demonstração do somatório dos sinais clínicos e diferenças estatísticas das análises clínicas
 169 realizadas dos cães tratados com os produtos LCF0 1003, LCF0 1004, LCFO 1005 e grupo controle. O
 170 símbolo (*) representa a diferença estatística entre os grupos avaliados.

171
 172 Quanto aos sinais clínicos específicos, assim como o somatório, diminuíram
 173 progressivamente, porém, observou-se que o prurido não apresentou diferença estatística entre
 174 os grupos. Já para o eritema ($p=0,06$), odor ($p=0,00$) e exsudato ($p=0,00$) notou-se uma melhora
 175 significativa do grupo LCFO 1005 em comparação aos demais grupos testados (Figura 2). Os
 176 sinais clínicos de edema, erosão e úlcera, por serem menos frequentes e envolvidos em quadros
 177 mais graves de otite, estavam presentes em um pequeno número de orelhas, os quais reduziram
 178 progressivamente com todos os tratamentos testados, portanto, não foi possível fazer uma
 179 comparação entre os grupos.

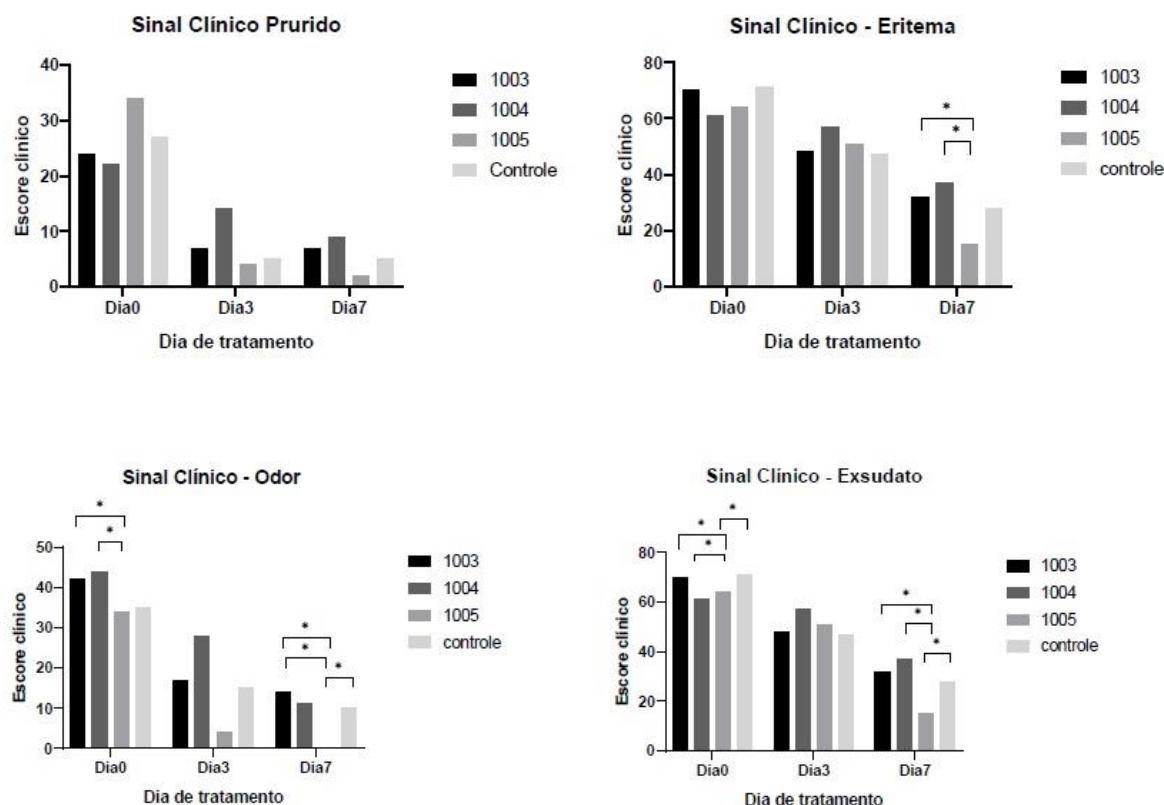


Figura 2. Demonstração do somatório dos sinais clínicos a) Prurido, b) Eritema, c) Odor e d) Exsudato, dos grupos tratados com os produtos LCFO 1003, LCFO 1004, LCFO 1005 e grupo controle. As letras representam as diferenças estatísticas entre as coletas e o símbolo (*) representam a diferença estatística entre os grupos.

A redução dos sinais clínicos pode estar relacionada à ação dos extratos vegetais, os quais são potencializados pela ação dos adjuvantes. Os extratos oriundos das plantas de urucum e trigo são conhecidos por possuírem ação cicatricial, sendo assim, demonstraram eficiência na cicatrização de feridas⁶. A ação do extrato aquoso de trigo a 25%, em outro estudo, foi responsável por reduzir os parâmetros clínicos e microbiológicos da otite externa, tornando-se uma opção promissora⁷. O urucum (*Bixa orellana*) frequentemente utilizado na medicina popular, apresenta propriedades pró-inflamatórias as quais recrutam células de defesa para o local da inflamação e consequentemente, através da resposta do organismo, melhoram os sinais clínicos. Além disso é conhecido por acelerar a formação de crostas e o processo cicatricial, possivelmente devido a altas concentrações de ácidos graxos, como os ácidos oleicos e linoleicos⁸, os quais também foram encontrados em nossa análise cromatográfica. Outras composições utilizando a combinação de extratos de urucum e trigo já se mostraram promissoras, sendo capaz de reduzir sinais clínicos de otite externa canina⁹.

O potencial antimicrobiano foi avaliado frente aos isolados da levedura *M. pachydermatis* e as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus coagulase negativa*, *Proteus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.* e polibactérias (Figuras 3 e 4). A levedura *M. pachydermatis* foi isolada em todos os grupos e demonstrou susceptibilidade a todos produtos testados, sendo demonstrado pelo teste de McNerman. Através do teste de Qui-quadrado observou-se que não houve diferença entre as coletas e os grupos de tratamento, demonstrando que todos os tratamentos foram efetivos sem ter diferença entre os grupos.

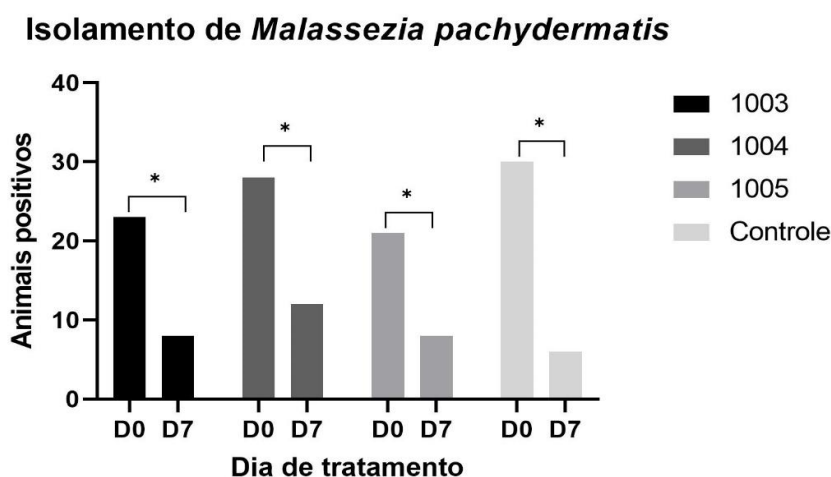


Figura 3. Demonstração dos isolamentos e resposta ao tratamento dos diferentes grupos teste e controle, frente a levedura *Malassezia pachydermatis* isoladas de cães com otite externa. O símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre o início (D0) e fim do tratamento (D7).

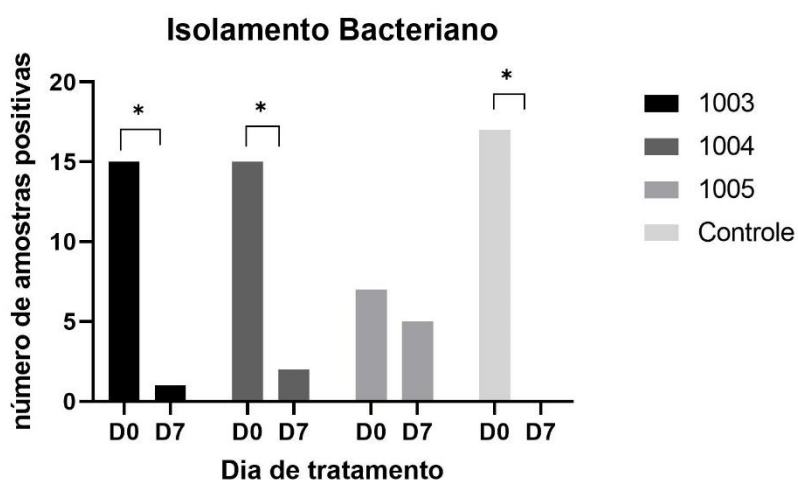


Figura 4. Demonstração dos isolamentos e resposta ao tratamento dos diferentes grupos teste e controle, frente a bactérias isoladas de cães com otite externa. O símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre o início e fim do tratamento.

Nos isolamentos bacterianos os grupos 1003, 1004 e controle demonstraram diferença estatística entre o período antes e após o término do tratamento, diminuindo o número de bactérias isoladas. Já o grupo 1005 não demonstrou diferença significativa no número de isolados, possivelmente devido ao menor número de isolados obtidos antes do início do tratamento (Figura 4).

Para as duas avaliações citológicas foi utilizado o teste estatístico de Wil-coxon para a comparação entre as coletas e o teste de Kruskal-wallis para a comparação entre os grupos. De acordo com a Figura 5, foi observado que a microbiota predominante foi composta por bactérias com morfologia de cocos, seguido pela levedura *Malassezia sp.*, e menos predominantemente bactérias com morfologia de bacilos. Todos os grupos testados apresentaram diferença estatística entre o início e o fim do tratamento, demonstrando que a carga microbiana reduziu em todos os grupos (Figura 5). Quanto a diferença entre os grupos testados houve diferença estatística no Dia 0 entre o grupo 1003 e 1005, e entre 1005 e controle, essa mesma diferença foi mantida ao final do tratamento no Dia 7, não demonstrando assim diferença na eficiência dos tratamentos testados. Através da escala semiquantitativa, foi possível avaliar que todos os grupos testados diminuíram a quantidade de microrganismos durante o tratamento, não diferindo entre eles (Figura 6).

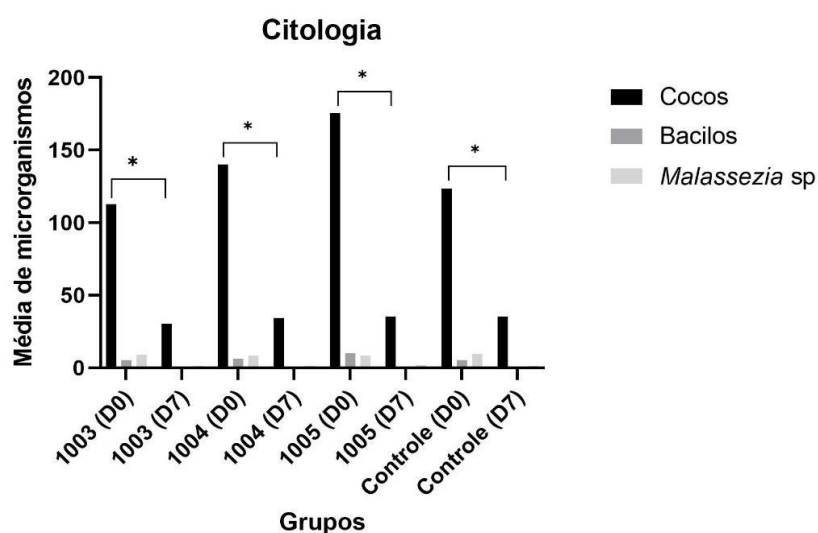


Figura 5. Demonstração da média de microrganismos cocos, bacilos e leveduras *Malassezia sp.*, avaliados nas amostras citológicas de cães com otite externa canina, tratados com os produtos teste (LFCO 1003, 1004, 1005 e controle), o símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre as coletas.

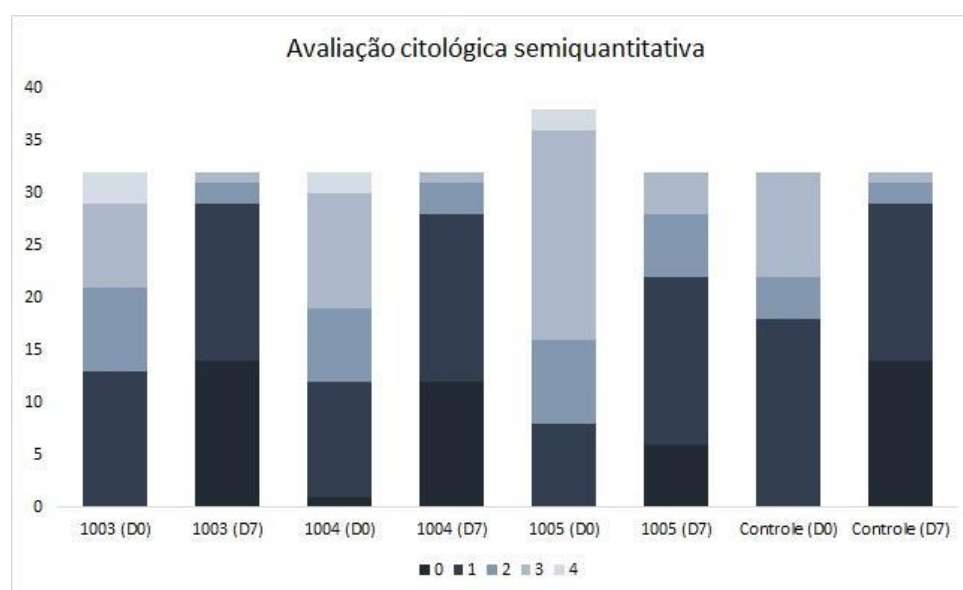


Figura 6. Demonstração da análise citológica semiquantitativa de cães com otite externa tratados com os grupos teste e grupo controle. As barras empilhadas demonstram o número de canais auditivos com diferentes pontuações.

Assim como possui ação cicatricial, os extratos que compõem nossos produtos também apresentaram ação antifúngica a leveduras *Candida albicans*¹⁰ e ação antibacteriana frente a bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp e *Staphylococcus aureus*¹¹.

Além da utilização dos extratos vegetais de *Bixa orellana* e *Triticum aestivum*, nosso produto apresenta em sua formulação o uso dos adjuvantes N-Acetilcisteína e TRIS-EDTA. Os adjuvantes são utilizados com a finalidade de aumentar a eficiência dos agentes microbianos através de diferentes mecanismos, como inibidores de enzimas que inativam antibióticos, inibidores de bomba de efluxo, permeabilizadores de membrana bacteriana, dispersores de biofilmes, inibidores de elementos de resistência a antibióticos e inibidores de vias fisiológicas celulares de bactérias. O uso dos adjuvantes TRIS-EDTA, EDTA dissódico e N-Acetilcisteína foram eficientes frente a cepas de patógenos óticos como *Malassezia pachydermatis*, *Staphylococcus pseudintermedius*, B-hemolítico, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*¹²

Nossa composição se diferencia de outros produtos otológicos pois apresenta princípios ativos que têm eficácia na inibição microbiana e na resolução do quadro inflamatório da otite. Os extratos de trigo e de urucum demonstram potencial antibacteriano e antifúngico e os fármacos n-acetilcisteína e tris-edta presentes na solução otológica são responsáveis por agirem como solventes do cerúmen, além de atuarem por diferentes vias facilitando a ação dos

antimicrobianos. Assim acreditamos que dessa forma esses fármacos potencializam a ação dos extratos vegetais de urucum e trigo.

Por se tratar de um estudo clínico, não foi possível equiparar os grupos em todos os critérios no início do tratamento, apresentando um viés na análise estatística da redução microbiana, já que nem todos os grupos apresentavam os mesmos microrganismos envolvidos por se tratarem de otites naturalmente desenvolvidas.

4. Conclusão

Os compostos LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005, foram eficazes para a redução dos sinais clínicos e número de microrganismos envolvidos em casos de otite externa canina, demonstrando eficiência equiparada com um produto comercialmente conhecido e amplamente utilizado.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

Referências

1. Bajwa J. Canine otitis externa - Treatment and complications. The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire Canadienne. 2019; 60 (1):97–99. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6294027/>
2. Marconi C. *Pseudomonas aeruginosa* na otite externa em animais de companhia: resistência aos antimicrobianos. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 47p. 2019.
3. Hlinica KA. Dermatologia De Pequenos Animais: Atlas Colorido e Guia Terapêutico. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 632p.
4. Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. Veterinary Dermatology. 2007; 18 (5):341-347. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2007.00619.x>
5. Budach SC, Mueller RS. Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. Veterinary Dermatology. 2012; 23(5):426-e80. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01075.x>
6. Capella SO, Krug F, Tillmann MT, Vianna R, Aranha BC, Chaves FC, Freitag RA, Bruhn FRP, Fernandes CG, Nobre MO. Potencial terapêutico de Fármacos com ativos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* no tratamento de lesões térmicas. Research, Society and

- Development. 2020; 9(3):29. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/338429837_Potencial_terapeutico_de_Farmacos_com_ativos_de_Bixa_orellana_L_e_Triticum_aestivum_no_tratamento_de_lesoes_termicas
7. Fernandes C, Hijano A, Lima C, Fontoura EG, Schramm RC, Félix SR, Nobre MO. A randomized, double blind, placebo-controlled study to assess the effect of an aqueous extract of *Triticum aestivum* on canine outer ear inflammation. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2017; 11(37):1270-1274. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100012>
8. Capella S, Tillmann MT, Félix AOC, Fontoura EG, Fernandes CG, Freitag RA, Santos MAZ, Félix SR, Nobre MO. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2016; 68(1):104-112. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8374>
9. Brito RSA, Capella SO, Hoffmann JF, Freitag RA, Pascoti Brum FR, Nascente PS, Costa Schramm R, Vianna R, Jorge S, Nobre MO. Avaliação de extratos vegetais em formulações farmacêuticas no tratamento da otite externa canina. Medicina Veterinária (UFRPE). 2021; 15(4):332-339. Disponível em:
<https://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria/article/view/3601/482484524>
10. Poma-Castillo L, Espinoza-Poma M, Mauricio F. Antifungal activity of ethanol-extracted *Bixa orellana* (L)(Achiote) on *Candida albicans*, at six different concentrations. The Journal of Contemporary Dental Practice. 2019; 20(10):1159-1163. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883250/>
11. Hussain MS, Singh M, Kumar B, Tewari D, Mansoor S, Ganesh N. Antimicrobial activity in ethanolic extracts of *Bixa orellana* L., *Simarouba glauca* DC and *Ocimum tenuiflorum* L. collected from JNCH herbal garden. World Journal of Pharmaceutical Research. 2020; 9(4):650-663. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/344047477_ANTIMICROBIAL_ACTIVITY_IN_ETHANOLIC_EXTRACTS_OF_BIXA_ORELLANA_L_SIMAROUBA_GLAUCA_DC_AND_OCIMUM_TENUIFLORUM_L_COLLECTED_FROM_JNCH_HERBAL_GARDEN
12. Chan WY, Khazandi M, Hickey EE, Page SW, Trott DJ, Hill PB. In vitro antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. Veterinary Dermatology. 2019; 30(2):133-138. Disponível em:
<https://doi.org/10.1111/vde.12712>

3.3 Artigo 3

Atividade ceruminolítica *in vitro* e *in vivo* em cães com otite tratados com produtos compostos por extratos vegetais

Risciela Salardi Alves de Brito; Eliezer Monteiro; Sergiane Baes Pereira; Giulia Freitas; Rogério António Freitag; Renato Vianna; Sérgio Jorge; Marcia de Oliveira Nobre

Será submetido à revista Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences

ATIVIDADE CERUMINOLÍTICA *IN VITRO* E *IN VIVO* EM CÃES COM OTITE TRATADOS COM PRODUTOS COMPOSTOS POR EXTRATOS VEGETAIS

RESUMO

Objetivou-se determinar a ação ceruminolítica *in vitro* e *in vivo* de três soluções otológicas compostas por extratos vegetais e adjuvantes. Foram produzidas as soluções otológicas LCFO 1003 (extratos vegetais etanólicos de *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* e Tris-EDTA), LCFO 1004 (extratos vegetais etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* e N-acetilcisteína), LCFO 1005 (extratos vegetais etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, Tris-EDTA e N-acetilcisteína) e grupo controle produto comercial a base de gentamicina, betametasona e clotrimazol. Para o estudo *in vitro* foi produzido cerúmen artificial canino o qual foi depositado no corpo de seringas de 1ml e acrescido das soluções otológicas com o marcador Oil red, as amostras foram armazenadas por 24 horas em banho maria e após foi mensurada a atividade de difusão de cada solução. Para o teste ceruminolítico 500mg do cerúmen foi depositado em tubos os quais foram acrescidos de 2ml das soluções otológicas, colocados em agitação por 20 min, secagem durante 1 hora e após foi realizada a pesagem para quantificar a perda de cerúmen, esse procedimento foi repetido por 5 vezes. Para o estudo *in vivo*, foram utilizados 64 cães os quais foram avaliados com um escore de acordo com a quantidade de cerúmen de 0-3, antes e após o tratamento. O estudo demonstrou variabilidade dos produtos testados nas análises de difusão e ceruminolítica *in vitro*. A solução otológica LCFO 1004 se comportou mais próximo à solução comercial controle. Já no ensaio *in vivo*, foi possível observar a eficácia de todas as soluções otológicas na redução de exsudato, destacando-se a solução LCFO 1005 como a mais potente.

Palavras-chaves: Cerúmen. *Triticum aestivum*. *Bixa orellana*. Tris-edta. N-acetilcisteína.

ABSTRACT

The objective was to determine the *in vitro* and *in vivo* ceruminolytic action of three otological solutions composed of plant extracts and adjuvants. Otological solutions were produced: LCFO 1003 (ethanolic plant extracts of *Triticum aestivum* and *Bixa orellana* and Tris-EDTA), LCFO 1004 (ethanolic plant extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana* and N-acetylcysteine), LCFO 1005 (ethanolic plant extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, Tris-EDTA and N-acetylcysteine) and control group commercial product based on gentamicin, betamethasone and

clotrimazole. For the in vitro study, artificial canine cerumen was produced, which was deposited in the body of 1ml syringes and added to otological solutions with the Oil red marker, the samples were stored for 24 hours in a water bath and after that the diffusion activity of each solution. For the ceruminolytic test, 500mg of cerumen was deposited in tubes, which were added with 2ml of otological solutions, stirred for 20 min, dried for 1 hour and then weighed to quantify the loss of cerumen, this procedure was repeated by 5 times. For the in vivo study, 64 dogs were used, which were evaluated with a score according to the amount of cerumen from 0-3, before and after treatment. The study demonstrated variability of the products tested in the in vitro diffusion and ceruminolytic analyses. The LCF0 1004 otologic solution behaved closer to the commercial control solution. In the in vivo test, it was possible to observe the effectiveness of all otological solutions in reducing exudate, with LCFO 1005 standing out as the most potent.

Keywords: Cerumen. *Triticum aestivum*. *Bixa orellana*. Tris-edta. N-acetylcysteine.

INTRODUÇÃO

A otite externa é conhecida por ser uma das principais causas de atendimento na dermatologia veterinária, sendo caracterizada por uma inflamação do meato acústico externo e pavilhão auricular. Apresenta sinais clínicos como prurido, otorréia, eritema, otalgia, odor pútrido/fétido, podendo evoluir, em casos crônicos, para sinais como hiperqueratose, hiperpigmentação, liquenificação e estenose (Saridomichelakis *et al.*, 2007; Hnilica & Patterson, 2018).

Em casos de otite externa ocorre um aumento das secreções ceruminosas que são mais aquosas e podem ajudar a controlar a proliferação bacteriana, durante a progressão da doença ocorre a hiperplasia das glândulas sebáceas e ceruminosas, reduzindo a movimentação do cerúmen pelo canal e desenvolvendo o excesso de exsudato (Huang *et al.*, 2009).

O uso de ceruminolíticos associado a terapia tópica é crucial para atingir eficácia terapêutica, uma vez que o tratamento deve ser administrado após a remoção mecânica de detritos e exsudatos no meato acústico, aumentando a permeabilidade dos medicamentos (Mueller *et al.*, 2013).

A maioria dos produtos ceruminolíticos tem em sua composição agentes que fazem a lise de escamas e detritos e possuem ação emulsificante (May *et al.*, 2016; Paterson, 2016). Compostos como a n-acetilcisteína e o tris-edta, tem sido estudados por sua ação emoliente e

por facilitar a penetração de agentes antimicrobianos (May *et al.*, 2016; Paterson, 2016), associado a eles, a utilização de extratos vegetais auxilia na melhora de sinais clínicos e redução da carga microbiana (Lopez, 2002). Dessa forma objetivou-se avaliar a ação ceruminolítica *in vivo* e *in vitro* de três soluções otológicas compostas por extratos vegetais e adjuvantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção dos extratos vegetais etanólicos

Para a produção dos extratos vegetais que compõe o produto as sementes de *Triticum aestivum* (trigo) e *Bixa orellana* (Urucum), foram obtidas comercialmente de uma empresa distribuidora de produtos naturais, após as sementes foram trituradas em moinho de facas e colocadas em uma solução com álcool etílico, as amostras foram passadas por um processo de sonificação por ultrassom durante 30 minutos, filtradas e para a remoção do solvente foi realizada rotaevaporação, obtendo assim os extratos etanólicos. Até a utilização, os extratos foram armazenados refrigerados à 4°C em frasco âmbar.

Preparo das soluções otológicas

As soluções otológicas foram confeccionadas a partir dos extratos vegetais os quais foram combinadas com adjuvantes, sendo produzidas três diferentes composições LCFO 1003 composta por extratos etanólicos de *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* e tris EDTA, LCFO 1004 extratos etanólicos de *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* e N-acetilcisteína, LCFO 1005 extratos etanólicos de *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* e tris EDTA e N-acetilcisteína. Todas as soluções otológicas também foram compostas pelos excipientes PEG 400, PEG 4000 e BHT.

Produção do cerúmen artificial

O cerúmen artificial canino foi produzido a partir do estudo de Sánchez-Leal *et al.*, (2006), sendo o composto por: 33,6% ácido mirístico, 33,6% ácido palmítico, 9,4% ácido oléico, 10,9% de colesterol e 12,5% de esqualeno. Para o preparo cada composto foi pesado em balança analítica, sendo colocados primeiramente os componentes sólidos ácido mirístico, ácido palmítico e colesterol, após acrescentados dos componentes líquidos ácido oléico e esqualeno, os compostos foram homogeneizados com a utilização de grau e pistilo. Após o

cerúmen foi fracionado em alíquotas de 500mg e colocados em tubos de 4cm, aquecidos em banho maria a uma temperatura de 41°C durante 5 min para o cerúmen compactar ao fundo do tubo assemelhando as condições naturais em que o cerúmen é encontrado no conduto auditivo do cão, para a solidificação os tubos foram colocados em uma temperatura de 35°C.

Teste ceruminolítico *in vitro*

A partir do cerúmen artificial disposto ao fundo do tubo conforme descrito por Sánchez-Leal *et al.* (2006), foi acrescentado 2 ml do produto teste em cada tubo LCF0 1003, LCFO 1004, LCF0 1005, como controle positivo foram utilizados dois produtos comerciais um produto de limpeza auditiva composto por aloe vera, ácido salicílico, óleo de calêndula e tris-EDTA e outro produto de tratamento composto por clotrimazol, gentamicina e betametasona como controle negativo foi utilizado água. Os tubos foram preenchidos em duplicatas e colocados em equipamento shaker utilizando 130 ciclos/min a temperatura 35°C durante 15 minutos, simulando o movimento da agitação da cabeça em um conduto auditivo canino. Após, os produtos foram retirados dos tubos que ficaram em posição invertida durante 1 hora permitindo que a mistura do cerúmen disperso e produto teste deslizar pelo tubo. Por fim, todos os tubos foram pesados novamente para quantificar a quantidade restante de cerúmen, esse procedimento foi repetido durante 5 vezes simulando aplicações consecutivas dos produtos. Os pesos iniciais e de cada repetição foram determinados ao fim para quantificar o total de cerúmen removido por cada produto teste.

Teste de Difusão

Para determinar a atividade de difusão das soluções otológicas foi utilizado a técnica descrita por Stahl *et al.* (2013) com adaptações. Foram preenchidos 50mm de uma seringa de 100 UI com o cerúmen artificial canino e adicionado 20mm das soluções teste, todas as amostras foram realizadas em duplicata. Antes de iniciar o experimento todos os produtos foram misturados com o marcador Oil Red – O (10mg/ml) que permite averiguar a velocidade e extensão da difusão dos produtos no cerúmen. As seringas preenchidas foram armazenadas em banho maria a temperatura de 32°C durante 24 horas, após esse período foi mensurada a atividade de difusão de acordo com a progressão dos produtos no cerúmen.

Avaliação *in vivo*

O experimento *in vivo* foi realizado mediante a aprovação no comitê de ética para uso animal (CEEAA 23110.051174/2019.15). Foram utilizados 64 cães aleatoriamente divididos em 4 grupos LCFO 1003, LCFO 1004, LCFO 1005 e grupo controle positivo a base de clotrimazol, betametasona e gentamicina. Como critérios de inclusão foram selecionados cães com pelo menos dois sinais clínicos como eritema, exsudato, prurido, otalgia e odor. Cada conduto auditivo foi avaliado através de vídeo otoscopia antes do tratamento sendo classificado de acordo com a quantidade de exsudato de 0-3 sendo 0 a forma mais leve de acometimento e 3 a forma mais intensa, todos os animais foram tratados uma vez ao dia com 4 gotas do produto em animais até 15 kg e 8 gotas para animais com mais de 15kg, o tratamento foi realizado por 7 dias, sendo as avaliações realizadas no dia 0 (antes do tratamento), dia 3 (metade do tratamento) e dia 7 (final do tratamento), posteriormente através da pontuação de acordo com o grau de intensidade foi realizada uma média por grupo e período de tratamento para estabelecer qual grupo apresentou melhor evolução.

Análises Estatísticas

Para a análise estatística foi utilizado o pacote estatístico SPSS ® 20.0, considerando um nível mínimo de significância de 95%. Para a comparação entre os grupos no experimento *in vitro* foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, já para o teste *in vivo* foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em nossos estudos *in vitro* ocorreram algumas limitações ocasionadas pela diferença da composição do cerúmen artificial, o qual altera a potência dos produtos, porém no estudo *in vivo* foi possível determinar que todas as soluções otológicas demonstraram redução de exsudato e melhora nos sinais clínicos nos cães tratados.

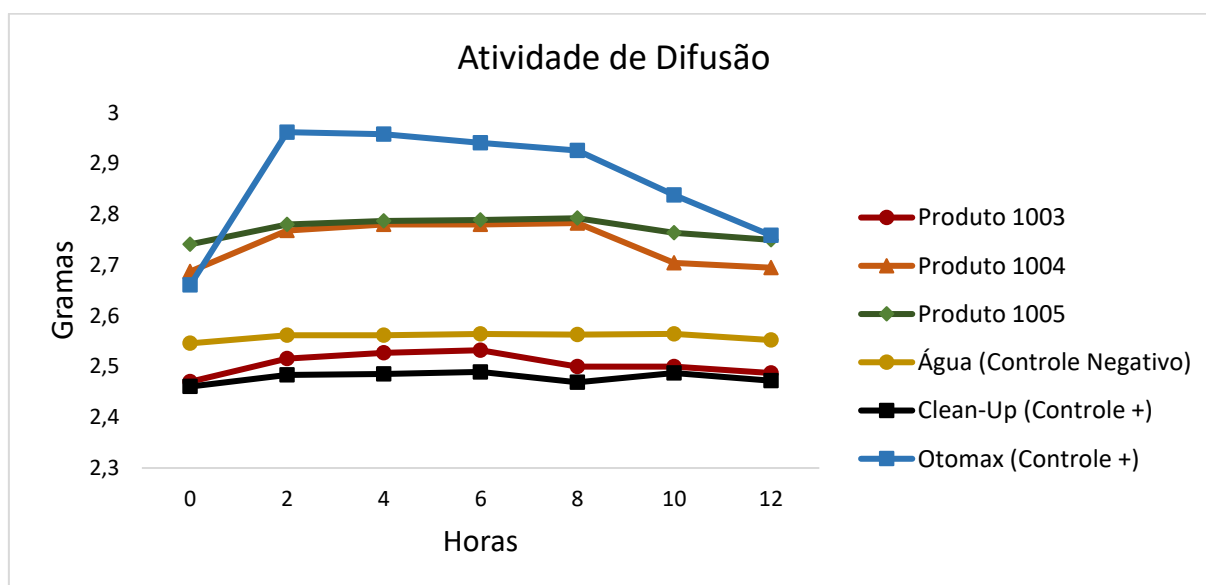
A extensão da atividade de difusão está demonstrada na Tabela 1, todos os produtos testados exibiram resultados semelhantes, ou seja, apresentaram a mesma ação penetrante no cerúmen, não apresentando diferença estatística entre eles, porém cabe destacar que o grupo 1004 apresentou maior atividade em comparação aos demais grupos testados, sendo superior ao grupo controle.

1 **Tabela I** – Quantificação da atividade de difusão nas soluções otológicas e grupo controle

Atividade de Difusão					
Controle +	1003	1004	1005	Água	Controle -
0,4	0,2	0,45	0,3	0,3	0,3
0,3	0,3	0,5	0,4	0,2	0,3

2
3 A capacidade de um produto entrar no cerúmen está diretamente relacionada com a
4 lipofilicidade do fármaco já que o cerúmen é um meio lipídico (Stahl *et al.*, 2013). Em nosso
5 estudo, podemos supor que o produto LCF0 1004 pode ter sido mais eficiente ao adentrar o
6 cerúmen devido à alta concentração de ácidos graxos provenientes dos extratos vegetais de
7 urucum e trigo associados a molécula de N-acetilcisteína, o que pode ter tornado o produto mais
8 lipofílico.

9 O teste de avaliação ceruminolítica *in vitro* demonstrou que todas as soluções otológicas
10 avaliadas mostraram ação semelhante quando comparadas entre si e com os produtos
11 disponíveis comercialmente. Durante o período de tratamento foi observado aumento do peso
12 com o passar do tempo devido ao efeito de impregnação dos produtos nos tubos (Figura 1).
13 Esse comportamento foi mais expressivo no grupo controle positivo com produto otológico de
14 tratamento (Gentamicina, betametasona e clotrimazol) (Figura 2). Foi possível notar que o
15 produto 1004 teve comportamento mais semelhante a este grupo controle.



17
18 **Figura 1** - Atividade ceruminolítica *in vitro* durante os períodos de tempo do teste.

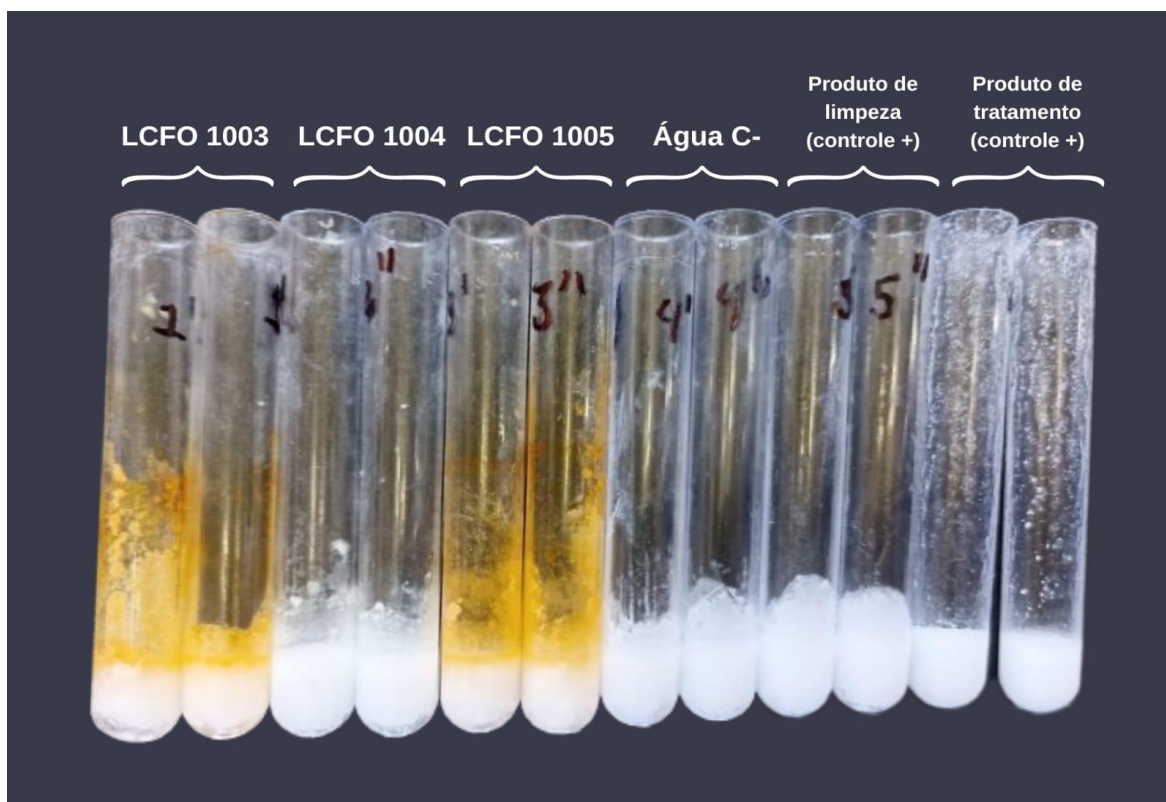


Figura 2 - Aparência visual dos tubos contendo cerúmen artificial canino ao final do teste ceruminolítico, demonstrando o efeito de impregnação na parede dos tubos.

Visualmente é possível perceber que alguns produtos sofreram efeito de impregnação, permanecendo uma certa quantidade do plug de cerúmen aderido ao tubo, não possibilitando assim quantificar de forma exata a quantidade de cerúmen dissolvida, porém é possível perceber que o grupo controle positivo teve maior ação em desmanchar o plug de cerúmen assim como sofreu grande efeito de impregnação. Em relação aos nossos produtos teste LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005 também foi possível visualizar esse efeito diferente do que ocorreu no controle negativo o qual foi utilizado água e no produto de limpeza auditiva comercial.

Outros estudos também corroboram com nossos resultados e demonstram que também houve ganho de peso ao final do teste devido ao efeito de impregnação causado pela composição química dos produtos que causa aderência aos tubos (Sánchez-Leal *et al.*, 2006; Stahl *et al.*, 2013).

Em contrapartida, no estudo *in vivo* houve uma melhora com diferença significativa nos animais tratados com o produto LCFO 1005 ($p=0,00$) (figura 3).

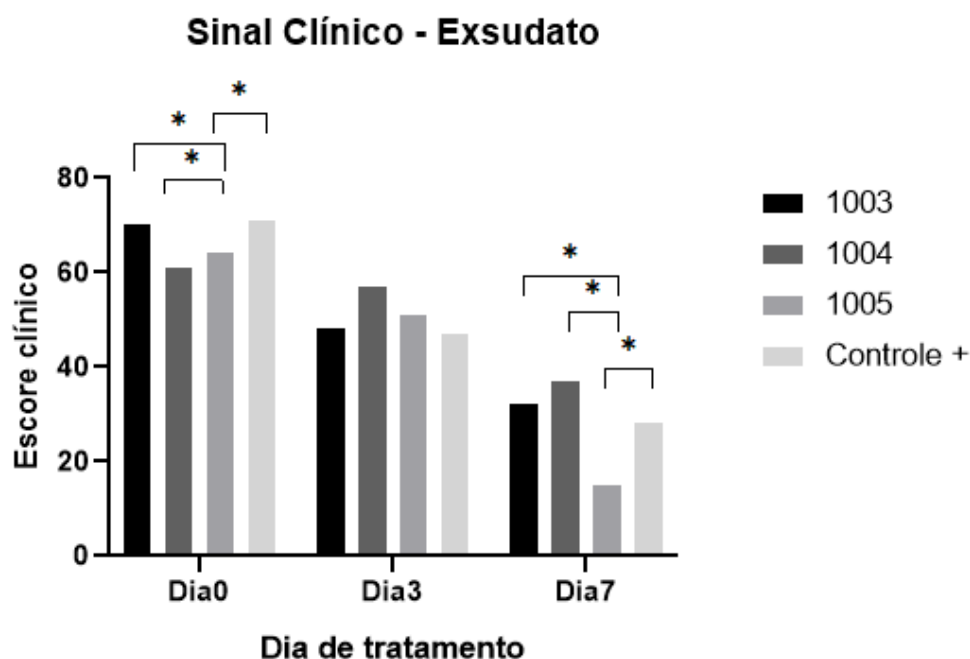


Figura 3 - Demonstração da atividade ceruminolítica *in vivo* dos produtos teste LCFO 1003, LCFO 1004, LCFO 1005 e Controle positivo em cães com sinais clínicos de otite externa.

Diferente do estudo *in vitro* onde o produto LCFO 1004 teve um resultado mais semelhante ao grupo controle positivo, *in vivo* foi observado que o grupo LCFO 1005 obteve uma ação mais potente chegando ao final sendo superior aos demais grupos incluindo o grupo tratado com o produto controle positivo. Também foi observado que todos os grupos tratados resultaram em melhora do sinal clínico após o tratamento.

A limpeza auditiva é peça chave para o tratamento da otite externa visto que remove o substrato para crescimento de fungos e bactérias presentes em casos de otite, podendo ser tratado assim casos leves de otite somente com agentes de limpeza evitando o uso indiscriminado de agentes antibióticos e antifúngicos, além de nos casos de uso concomitante permitir melhor contato do agente antimicrobiano com a pele afetada (Paterson, 2016; Scherer *et al.*, 2016).

O uso de derivados vegetais em produtos otológicos atualmente tem ganhado espaço na indústria devido à alta biodisponibilidade da flora brasileira e diversas funções proporcionadas, como o efeito antiinflamatório, antifúngico, antipruriginoso e antibacteriano, essas ações são descritas em extratos vegetais como das plantas *Cetraria islandica*, *Cucumis sativus*, *Mimosa tenuiflora*, *Cetraria islandica* e *Chamomilla recutita* (Lopez, 2007).

As plantas *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* que compõe as soluções otológicas são conhecidas por apresentarem ação antimicrobiana frente a fungos e bactérias (Supria *et al.*,

2018; Poma-Castillo *et al.*, 2019; Hussain *et al.*, 2020) assim como já demonstraram ação dos extratos vegetais oleosos e etanólicos em estudos anteriores na melhora dos sinais clínicos de otite externa canina (Brito *et al.*, 2021).

O uso dos fármacos n-acetilcisteína e Tris-edta tem sido empregado na dermatologia veterinária, sendo sua aplicabilidade dentro da otite funcionar como monolítico, solvente/emoliente auxiliando na remoção de exsudato e também auxiliando na prevenção e tratamento de biofilmes devido às propriedades de funcionarem como permeabilizadores de membrana (May *et al.*, 2016; Boyd *et al.*, 2019).

Assim como relatado por outros autores o estudo *in vitro* apresentou limitações já que somente foi capaz de avaliar a atividade lipolítica dos produtos testados, considerando que o cerúmen natural apresenta demais componentes como queratinócitos e proteínas que podem interferir na eficiência dos fármacos testados (Sánchez-Leal *et al.*, 2006; Stahl *et al.*, 2013). Esse viés pode ser reduzido através do nosso estudo *in vivo* o qual demonstrou boa ação ceruminolítica dos produtos testados.

O presente estudo demonstra variabilidade dos produtos testados nas análises de difusão e ceruminolítica *in vitro*, neste ensaio a solução otológica LCFO 1004 apresenta comportamento próximo à solução comercial utilizada como controle positivo. Já no ensaio *in vivo* é possível observar a eficácia de todas as soluções otológicas na redução de exsudato, destacando-se a solução LCFO 1005 como a mais potente.

REFERÊNCIAS

Boyd M, Santoro D, Gram D. In vitro antimicrobial activity of topical otological antimicrobials and Tris-EDTA against resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs. Vet Dermatol. 2019;30(2):139-e40.

Brito RSA, Capella SO, Hoffmann JF, Freitag RA, Brum FRP, da Silva Nascente P, Nobre MO. Avaliação de extratos vegetais em formulações farmacêuticas no tratamento da otite externa canina. Med Vet (UFRPE). 2021;15(4):332-339.

Hnlica KA, Patterson AP. Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 656p.

- 1 Huang HP, Little CJ, McNeil PE. Histological changes in the external ear canal of dogs with
2 otitis externa. Vet Dermatol. 2009;20(5-6):422-8.
- 3
- 4 Hussain MS, Singh M, Kumar B, Tewari D, Mansoor S, Ganesh N. Antimicrobial activity in
5 ethanolic extracts of *Bixa orellana* L., *Simarouba glauca* DC and *Ocimum tenuiflorum* L.
6 collected from JNCH herbal garden. World J Pharm Res. 2020;9(4):650-663.
- 7
- 8 Lopez CA. Preparation for veterinary use. Patent No. EP1228784A2. Esteve Pharmaceuticals
9 AS, 2002.
- 10
- 11 May ER, Conklin KA, Bemis DA. Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine
12 otitis externa isolates. Vet Dermatol. 2016;27(3):188-e47.
- 13
- 14 Mueller EN, Guiot ÊG, Santin R, Meireles MCA, Schuch LFD, Nobre MDO. Efeito auxiliar
15 do ceruminolítico na terapia tópica de cães (*Canis lupus familiaris*) com otite externa
16 ceruminosa. Cienc Anim Bras. 2013;14:59-64.
- 17
- 18 Paterson S. Topical ear treatment - options, indications and limitations of current therapy. J
19 Small Anim Pract. 2016;57(12):668-678.
- 20
- 21 Poma-Castillo L, Espinoza-Poma M, Mauricio F, Mauricio-Vilchez C, Alvétez-Temoche D,
22 Mayta-Tovalino F. Antifungal activity of ethanol-extracted *Bixa orellana* (L) (Achiote) on
23 *Candida albicans*, at six different concentrations. J Contemp Dent Pract. 2019;20(10):1159-
24 1163.
- 25
- 26 Sánchez-Leal J, Mayós I, Homedes J, Ferrer L. *In vitro* investigation of ceruminolytic activity
27 of various otic cleansers for veterinary use. Vet Dermatol. 2006;17(2):121-7.
- 28
- 29 Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis
30 externa: a retrospective study of 100 cases. Vet Dermatol. 2007;18(5):341-7.
- 31
- 32 Scherer CB, Botoni LS, Keller KM, Coura FM, Carvalho AÚ, Costa-Val AP. (2021). *In vitro*
33 evaluation of the antimicrobial activity and diffusion capacity of solutions used for canine ear
34 cleaning. Res Soc Dev. 2021; 10(10): e539101019285-e539101019285.

- 1 Stahl J, Mielke S, Pankow, WR, Kietzmann M. Ceruminal diffusion activities and
2 ceruminolytic characteristics of otic preparations–an in-vitro study. BMC Vet Res. 2013;
3 9(1):1-8.
4
- 5 Surpria S, Zohorul I, Sadequl I, Shahadat H, Shahinul I. Evaluation of antimicrobial activity of
6 Wheat (*Triticum aestivum* L.) Against four bacterial strains. India J. 2018;20(1):58-62.

4 Considerações Finais

- As formulações otológicas LCFO 1003 (Extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa Orellana*, Tris-Edta), LCFO 1004 (Extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa Orellana*, N-acetilcisteína) e LCFO 1005 (Extratos etanólicos de *Triticum aestivum*, *Bixa Orellana*, Tris-Edta e N-acetilcisteína) foram eficientes na inibição de microrganismos isolados em casos de otite externa canina.

- As formulações otológicas LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005 apresentaram eficiência na redução de sinais clínicos de otite externa canina e redução da carga microbiana.

- Os produtos otológicos LCFO 1003, LCFO 1004 e LCFO 1005, apresentam ação ceruminolítica, contribuindo para o tratamento da otite externa canina.

- As soluções otológicas devido sua eficiência nos experimentos são passíveis de reivindicação de patente e utilização comercial.

- O estudo da eficiência ceruminolítica *in vitro* pode ser aprimorado testando outras técnicas para melhor confiabilidade e outros critérios como o valor de pH das soluções otológicas.

Referências

ABAYOMI, M.; ADEBAYO, A. S.; BENNETT, D.; PORTER, R.; SHELLY-CAMPBELL, J.; DAWKIN, G. Phytochemical testing and *in vitro* antibacterial activity of *Bixa orellana* (annatto) seed extract. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 4, p. 1387–1399, 2004.

ALIM, S.; BAIRAGI, N.; SHAHRIYAR, S.; KABIR, M. M.; RAHMAN, M. H. *In vitro* antibacterial potential of *Bixa orellana* L. against some pathogenic bacteria and comparative investigation on some standard antibiotics. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 2, p. 178-181, 2016.

BAJWA, J. Canine otitis externa—Treatment and complications. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 60, n. 1, p. 97-99, 2019.

BLASKOVIC, M.; ROSENKRANTZ, W.; NEUBER, A. The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. **The Veterinary Journal**, v. 199, n. 1, p. 39-43, 2014.

BORRIELLO, G.; PARADISO, R.; CATOZZI, C.; BRUNETTI, R.; ROCCABIANCA, P.; RICCARDI, M. G.; GALIERO, G. Cerumen microbial community shifts between healthy and otitis affected dogs. **PLoS One**, v. 15, n. 11, e0241447, 2020.

BOYD, M.; Santoro, D.; Gram, D. *In vitro* antimicrobial activity of topical otological antimicrobials and Tris-EDTA against resistant *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 30, n. 2, p. 130-140, 2019.

BRITO, Riscieli Salardi Alves. **Avaliação do potencial terapêutico de formulações otológicas com extratos vegetais no tratamento da otite externa canina**. 2019. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

BRITO, R. S. A.; CAPELLA, S. O.; HOFFMANN, J. F.; FREITAG, R. A.; BRUM, F. R. P.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O. Avaliação de extratos vegetais em formulações farmacêuticas no tratamento da otite externa canina. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 15, n. 4, p. 332-339, 2021.

BUDACH, S. C.; MUELLER, R. S. Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 5, p. 426-e80, 2012.

CAMARGO, M. T. L. A. **Plantas medicinais e de mituais afro-brasileiros**. 1 ed. Almed: São Paulo, 1988. 232p.

CAPELLA, S. O.; TILLMANN, M. T.; FÉLIX, A. O. C.; FONTOURA, E. G.; FERNANDES, C. G.; FREITAG, R. A.; SANTOS, M. A. Z.; FÉLIX, S. R.; NOBRE, M. O. Potencial cicatricial da *Bixa orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 1, p. 104-112, 2016.

CAPELLA, S. O.; KRUG, F.; TILLMANN, M. T.; VIANNA, R.; ARANHA, B. C.; CHAVES, F. C.; NOBRE, M. O. Potencial terapêutico de fármacos com ativos de *Bixa orellana* L. e *Triticum aestivum* no tratamento de lesões térmicas. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 3, p. 29, 2020.

CASTELLO, M. C.; PHATAK, A.; CHANDRA, N.; SHARON, M. Antimicrobial activity of crude extracts from plant parts and corresponding calli of *Bixa orellana* L. **NIScPR Online Periodicals Repository**, v. 40, n. 12, p. 1378-1381, 2002.

CASTRO, C. B.; MARTINS, C. S.; FALES, I. C.; NAZARE, R. F. R.; KATO, O. H.; BENCHIMOL, R. L.; VENTURIERI, M. M. A Cultura do Urucum. 2 ed. **Embrapa Informação Tecnológica**. 2009. 61p.

CAVALCANTE, A. G. M. & BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n. 12, 2009.

CHAN, W. Y.; KHAZANDI, M.; HICKEY, E. E. *In vitro* antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. **Veterinary dermatology**, v. 30, n. 2, p. 133-138, 2019.

COLE, L. K. Anatomy and physiology of the canine ear. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 412-421, 2009.

CONRAD, O. A.; DIKE, I. P.; AGBARA, U. *In vivo* antioxidant assessment of two antimalarial plants—*Allamanda cathartica* and *Bixa orellana*. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 3, n. 5, p. 388-394, 2013.

CURIMBABA, Tainan Freitas Salmeron. **Avaliação da atividade anti-inflamatória intestinal do extrato das folhas jovens de *Triticum aestivum* L. obtido por cultivo em Casa de Vegetação**. 2012. 37f. Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

DE SANTIAGO, M. S.; ARRIBAS, J. L. G.; LLAMAS, Y. M.; BECVAROVA, I.; MEYER, H. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial measuring the effect of a dietetic food on dermatologic scoring and pruritus in dogs with atopic dermatitis. **BMC Veterinary Research**, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2021.

DINESH, M. G.; SATYAN, R. S.; CHANDRASEKARAN, B.; ROSE, C. Leaf and seed extracts of *Bixa orellana* L. exert anti-microbial activity against bacterial pathogens. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 9, p. 116-120, 2011.

EICHENBERG, M. L.; APPELT, C. E.; BERG, V.; MUSCHNER, A. C.; NOBRE, M. D. O.; MATTA, D. D.; FERREIRO, L. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, n. 2, p. 75-80, 2003.

FALANGA, Genaro. Otic detergent composition for animals, with edta and chlorexhidine. **Patente. EP1711158B1**, França, 2009.

FERNANDES, C. P.; HIJANO, A.; LIMA, C. S.; FONTOURA, E.G.; SCHRAMM, R. C.; FÉLIX, S. R.; NOBRE, M. O. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to assess the effect of an aqueous extract of *Triticum aestivum* on canine outer ear inflammation. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 11, n. 37, p.1270-1274, 2017.

FONTOURA, Eduardo Garcia. **Rosmarinus officinalis L. e Triticum aestivum no tratamento da otite externa infecciosa**. 2014. 51 f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

GALINDO-CUSPINERA, V.; LUBRAN, M. B.; RANKIN, S. A. Comparison of volatile compounds in water-and oil-soluble annatto (*Bixa orellana* L.) extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2010-2015, 2002.

GBADAMOSIS, S. & GOTTHELF, L. N. Evaluation of the *in vitro* effect of Tris–EDTA on the minimum inhibitory concentration of enrofloxacin against ciprofloxacin resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Veterinary Dermatology**, v. 14, p. 222, 2003.

GOLDSCHMIDT, M. C. & WYSS, O. The role of tris in EDTA toxicity and lysozyme lysis. **Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 421–431, 1967.

GÓMEZ, G. C.; CASTILLO, J. C. Q., PÉREZ, J. C. A., ZAPATA, M. J. E. Ethanolic extract from leaves of *Bixa orellana* L.: A potential natural food preservative. **Interciencia**, v. 37, n. 7, p. 547, 2012.

GOTTHELF, L. N. Diagnosis and treatment of otitis externa, the 4 step approach to otitis externa, otitis media, history and clinical signs of otitis media. **IVIS**. p.11-18, 2009.

GRAY, G. & WILKINSON, S. The action of ethylenediaminetetra-acetic acid on *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 28, n. 19, p. 153–164, 1965.

GRIFFIN, E. C. Approach to the Chronic Ear Case. **Proceeding of the 82nd Western Veterinary Conference**. Congress: Las Vegas. Nevada, 2010.

HAN, J. I.; PARK, S. J.; KIM, S. G.; PARK, H. M. Antimicrobial effects of topical skin cream containing natural oil mixtures against *Staphylococcus pseudintermedius* and *Malassezia pachydermatis*. **Veterinarni Medicina**, v. 60, n. 4, p. 202-207, 2015.

HARVEY, G. R., PATERSON, S. Otitis Externa - An Essential Guide to Diagnosis and Treatment. U.S: **Taylor & Francis Group**, LL, 2014.

HEDLUND, C.S. **Surgery of the Integumentary System**. In: FOSSUM, T. W. Small animal surgery. 3 ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2007. p. 161 – 259.

HENSEL, P. **Ear Swabs: Technique & Interpretation**. NAVC Clinician's Brief, University of Georgia, 2009. p. 29-31.

HLINICA, K. A. **Dermatologia De Pequenos Animais: Atlas Colorido e Guia Terapêutico**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 632p.

HNLICA, K. A. & PATTERSON, A. P. **Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico**. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 656p.

HUANG, H. P.; LITTLE, C. J.; MCNEIL, P. E. Histological changes in the external ear canal of dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 422-428, 2009.

HUSSAIN, M. S.; SINGH, M.; KUMAR, B.; TEWARI, D.; MANSOOR, S.; GANESH, N. Antimicrobial activity in ethanolic extracts of *Bixa orellana* L., *Simarouba glauca* DC, and *Ocimum tenuiflorum* L. collected from JNCH herbal garden. **World Journal of Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 4, p. 650-663, 2020.

JANECZEK, M.; MOY, L.; RIOPELLE, A.; VETTER, O.; RESERVA, J.; TUNG, R.; SWAN, J. The potential uses of N-acetylcysteine in dermatology: a review. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 12, n. 5, p. 20, 2019.

JOSHI, A. K.; KUMARI, M.; SINGH, V. P.; REDDY, C. M.; KUMAR, S.; RANE, J.; CHAND, R. Stay green trait: variation, inheritance and its association with spot blotch resistance in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). **Euphytica**, v. 153, p. 59-71, 2007.

KORBELIK, J.; SINGH, A.; ROUSSEAU, J.; WEESE, J. S. Analysis of the otic mycobiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. **Veterinary dermatology**, v. 29, n. 5, p. 417-138, 2018.

KWON, J.; YANG, M. H.; KO, H. J.; KIM, S. G.; PARK, C.; PARK, S. C. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Proteus mirabilis* isolated from Dog with chronic otitis externa. **Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1215, 2022.

LOGAS, D. B. Diseases of the ear canal. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 24, n. 5, p. 905-919, 1994.

LOPEZ, C. A. Preparation for veterinary use. **Patent No. EP1228784A2**. Esteve Pharmaceuticals AS, 2002.

LOZANO-NAVARRO, J. I.; DÍAZ-ZAVALA, N. P.; VELASCO-SANTOS, C.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, A. L.; TIJERINA-RAMOS, B. I.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.; REYES-DE LA TORRE, A. I. Antimicrobial, optical and mechanical properties of chitosan–starch films with natural extracts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, p. 997, 2017.

LUJÁN-ROCA, D. Á.; SAAVEDRA-ESPINOZA, L.; LUJÁN-ROCA, L. M. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from dogs at a veterinary clinic in Callao, Peru. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 18, n. 9, p. 1-7, 2017.

MARCONI, Cláudia. ***Pseudomonas aeruginosa* na otite externa em animais de companhia: resistência aos antimicrobianos**. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Lisboa, 47p. 2019.

MASUCCI, O. **As plantas como remédio na cura de doenças**. Brasilivros: São Paulo, 1982.

MAY, E. R.; CONKLIN, K. A.; BEMIS, D. A. Antibacterial effect of N-acetylcysteine on common canine otitis externa isolates. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 3, p. 188-e47, 2016.

MIDDELVEEN, M. J.; STRIEKER, R. B. Doença de Morgellons: uma dermatite vorrelial filamentosa. **International Journal of General Medicine**, v. 9, p. 349–354, 2016.

MOREIRA, V. S.; REBOUÇAS, T. N. H.; DE MORAES, M. O. B.; SÃO JOSÉ, A. R.; DA SILVA, M. V. Antioxidant activity of annatto (*Bixa orellana* L.) in nature and encapsulated. **Revista Iberoamericana de Tecnologia Postcosecha**, v. 15, n. 2, p. 201-209, 2014.

MUELLER, E. N.; GUIOT, Ê. G.; SANTIN, R.; MEIRELES, M. C. A.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O. Efeito auxiliar do ceruminolítico na terapia tópica de cães (*Canis lupus familiaris*) com otite externa ceruminosa. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, p. 59-64, 2013.

NASCENTE, Patricia da Silva. **Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da sensibilidade *in vitro* e *in vivo* frente a antifúngico**. 2006. 135f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

NATIVIDAD, L. R. & RAFAEL, R. R. Carotenoid analyses and antibacterial assay of annatto (*Bixa oerellana* L.), carrot (*Daucus carota* L.), corn (*Zea mays* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L) Extracts. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 3, n. 3, p. 40-45, 2014.

PATERSON, S. Topical ear treatment—options, indications and limitations of current therapy. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 12, p. 668-678, 2016.

PAVLETIC, M. M. **Atlas of small animal management and reconstructive surgery**. 3. ed. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010. 680p.

POMA-CASTILLO, L.; ESPINOZA-POMA, M.; MAURICIO, F.; MAURICIO-VILCHEZ, C.; ALVÍTEZ-TEMOCHE, D.; MAYTA-TOVALINO, F. Antifungal activity of ethanol-extracted *Bixa orellana* (L)(Achiote) on *Candida albicans*, at six different concentrations. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 20, n. 10, p. 1159-1163, 2019.

PUIGDEMONT, A.; D'ANDREANO, S.; RAMIÓ-LLUCH, L.; CUSCÓ, A.; FRANCINO, O.; BRAZIS, P. Effect of an anti-inflammatory pomegranate otic treatment on the clinical evolution and microbiota profile of dogs with otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v. 32, n. 2, p.1 58-e37, 2021.

PYE, C. *Pseudomonas* otitis externa in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 59, n. 11, p. 1231, 2018.

RAJORIA, A.; MEHTA, A.; MEHTA, P.; AHIRWAL, L.; SHUKLA, S. Phytochemical analysis and estimation of major bioactive compounds from *Triticum aestivum* L. grass with antimicrobial potential. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 6, p. 2221-2225, 2015.

RÊGO, T. J. A. **Fitogeografia das plantas medicinais no Maranhão**. 2 ed. São Luis: UFMA, 1995. 133p.

SAHA, S.; ZOHORUL, I.; SADEQUI, I.; SHAHADAT, I.; SHAHINUL, I. Evaluation of antimicrobial activity of wheat (*Triticum aestivum* L.) against four bacterial strains. **SKUAST Journal of Research**, v. 20, n. 1, p. 58-62, 2018.

SÁNCHEZ-LEAL, J.; MAYOS, I.; HOMEDES, J.; FERRER, L. *In vitro* investigation of ceruminolytic activity of various otic cleansers for veterinary use. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 2, p. 121-127, 2006.

SANTIAGO, M. S.; ARRIBAS, J. L. G.; LLAMAS, Y. M.; BECVAROVA, I.; MEYER, H. Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial measuring the effect of a dietetic food on dermatologic scoring and pruritus in dogs with atopic dermatitis. **BMC Veterinary Research**, v. 17, p. 1-8, 2021.

SANTIN, R.; GIORDANI, C.; MADRID, I. M.; MATOS, C. B. D.; FREITAG, R. A.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. D. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 367-373, 2014.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; FARMAKI, R.; LEONTIDES, L. S.; KOUTINAS, A. F. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 18, n. 5, p. 341-347, 2007.

SCHEEREN, P. L.; CASTRO, R. L.; CAIERAO, E. **Botânica, morfologia e descrição fenotípica Trigo: do plantio à colheita**. Viçosa, 2015. p. 35-55.

SCHERER, C. B.; BOTONI, L. S.; KELLER, K. M.; COURA, F. M.; CARVALHO, A. Ú.; COSTA-VAL, A. P. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity and diffusion capacity of solutions used for canine ear cleaning. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, e539101019285-e539101019285, 2021.

SHAW, S. Pathogens in otitis externa: diagnostic techniques to identify secondary causes of ear disease. **In Practice**, v. 38, p. 12-16, 2016.

SHILPI, J. A.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, M.; UDDIN, S. J.; ALAM, M. S.; SADHU, S. K.; SEIDEL, V. Preliminary pharmacological screening of *Bixa orellana* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 264-271, 2006.

SIM, J. X. F.; KHAZANDI, M.; PI, H.; VENTER, H.; TROTT, D. J.; DEO, P. Antimicrobial effects of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde combined with EDTA against canine otitis externa pathogens. **Journal of applied Microbiology**, v. 127, n. 1, p. 99-108, 2019.

SOLÓRZANO, O. T.; REYNA, H. H.; VELÁZQUEZ, J. L. L.; AGUILAR, J. P.; VALENCIA, M. G. Evaluación de la actividad reepitelizante del *Triticum vulgare* en la cervicitis crônica erosiva. **Revista de la Facultad de Medicina UNAM**, v. 44, n. 1, p. 8-11, 2001.

STAHL, J.; MIELKE, S.; PANKOW, W. R.; KIETZMANN, M. Ceruminal diffusion activities and ceruminolytic characteristics of otic preparations—an *in-vitro* study. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2013.

STEHL, M. E.; HANCZARUK, M.; SCHWARZ, S. C.; GÖBEL, T. W.; MUELLER, R. S. Effects of polyunsaturated fatty acids on isolated canine peripheral blood mononuclear cells and cytokine expression (IL-4, IFN- γ , TGF- β) in healthy and atopic dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 113-118, 2010.

SUMATHI, P. & PARVATHI, A. Antibacterial potential of the aqueous and organic extracts of *Bixa orellana* L. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 2, 2011.

SURPRIA, S.; ZOHORUL, I.; SADEQUL, I.; SHAHADAT, H.; SHAHINUL, I. Evaluation of antimicrobial activity of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Against four bacterial strains. **India Journals**, v. 20, n. 1, p. 58-62, 2018.

TILLMANN, M. T.; FELIX, A. O. C.; MUELLER, E. M.; FELIX, S. R.; ALVES, G. H.; RAMOS, T. S.; FREITAG, R. A.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O. Use of *Triticum aestivum* in open wound healing: a clinical, pathological, and tensiometric assessment in the rabbit model. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1757-1761, 2014.

TILLMANN, M. T.; MENDES, C. B. M.; FISCHER, G.; JÚNIOR, A. S. V.; FERNANDES, C. G.; NOBRE, M. O. *Triticum aestivum* in open skin wounds: cytotoxicity and collagen histopathology. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 1547-1554, 2018.

WIRTHERLE, N. C. & ZOTTMAIER, B. Formulation and composition for preventing and/or dissolving biofilm on the skin of a domestic animal. **US20190298650A1 Patente**, n. 16, p.369-964, 2019.

WOOLEY, R. E. Methods and compositions for promoting wound healing. **PatentUS8709393B2**, Estados Unidos, 2015.

YOKE, K. Y.; ARIFAH, A. K.; SUKARDI, S.; ROSLIDA, A. H.; SOMCHIT, M. N.; ZURAINI, A. *Bixa orellana* leaves extract inhibits bradykinin-induced inflammation through suppression of nitric oxide production. **Medical Principles and Practice**, v. 20, n. 2, p. 142–6, 2011.

ZURAINI, A.; SOMCHIT, M.; ABDUL HAMID, R.; SUKARDI, S.; FAZIRA, A. J.; YONG, Y.; LEE, H. K.; CHENG, X. Q. Inhibitions of acute and chronic inflammations by *Bixa orellana* leaves extract. **Planta Medica**, v. 73, n. 9, p. 76, 2007.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

07/01/2020

SEI/UFPeI - 0841416 - Parecer



PARECER Nº
PROCESSO Nº

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
2/2020/CEEA/REITORIA
23110.051174/2019-15

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Potencial terapêutico de formulações otológicas com extratos vegetais no tratamento da otite externa canina”**, registrada com o nº 23110.051174/2019-15, sob a responsabilidade de **Márcia de Oliveira Nobre** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de **17 de dezembro de 2019**.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	01/03/2020 a 28/02/2022
Espécie/linhagem/raça	Canina/variada
Nº de animais	45
Idade	1-15 anos
Sexo	23 machos e 22 fêmeas
Origem	Animais atendidos no Hospital de Clínicas Veterinárias-UFPeI ou em seus próprios domicílios.

Código para cadastro nº CEEA 51174-2019

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

(

Presidente da CEEA

Documento assinado eletronicamente por **ANELIZE DE OLIVEIRA CAMPELLO FELIX, Médico Veterinário**, em 07/01/2020, às 09:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0841416** e o código CRC **4A4D8803**.

Referência: Processo nº 23110.051174/2019-15

SEI nº 0841416

Anexo II – Solicitação de Patente
Registro de Pedido de Patente



01/03/2023 870230017345
11:22

29409161961369256

**Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de
Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT**

Número do Processo: BR 10 2023 003830 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 92242080000100

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Gomes Carneiro, 01 - Ed. Delfim Mendes Silveira - Campus
Porto/Reitoria - 4º Andar - PRPPG

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96010-610

País: Brasil

Telefone: (53) 3284 4086

Fax:

Email: epitte@ufpel.edu.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Produto otológico composto por extratos vegetais e adjuvantes para tratamento de otite externa canina

Resumo: Esta invenção refere-se a uma solução otológica que objetiva o tratamento de otites e a remoção de cerúmen sem a utilização de antibióticos, antifúngicos convencionais e glicocorticoides. A solução é composta por extratos vegetais etanoicos das plantas *Triticum aestivum* e *Bixa orellana* associados aos ativos tris-edta e/ou N acetilcisteína, a formulação utiliza como excipiente o polietilenoglicol 4000 e polietilenoglicol 400, mantendo o produto em estado semissólido. O produto age através da eficiência sinérgica da sua composição, possibilitando a redução dos sinais clínicos comuns de otite como eritema, exsudato, otalgia e odor, assim como estimula a reparação tecidual mais rapidamente. Associado a melhora clínica, também apresenta eficiência antibacteriana frente a bactérias do gênero *Staphylococcus* sp frequentemente isoladas de casos de otite e eficiência antifúngica a levedura *Malassezia pachydermatis*, principal fator perpetuante de otite externa. Assim, a solução otológica permite a resolução dos casos clínicos de otite externa tomando-se uma nova opção para o tratamento da otite externa em cães.

Figura a publicar: 1

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 11

Nome: MARCIA DE OLIVEIRA NOBRE

CPF: 36946133072

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Praça Nova Palma 41 Laranjal

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96090-450

País: BRASIL

Telefone: (53) 981 146467

Fax:

Email: marciaonobre@gmail.com

Inventor 2 de 11

Nome: RISCIELA SALARDI ALVES DE BRITO

CPF: 08615229902

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Marcos Costa 214, bloco 12 ap 446, Fragata

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96040-750

País: BRASIL

Telefone: (86) 152 29902

Fax:

Email: riscielas234@yahoo.com.br

Inventor 3 de 11

Nome: RENATO VIANNA

CPF: 28891767034

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Dr. Amarante, 580- Centro

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96020-720

País: BRASIL

Telefone: (53) 991 074649

Fax:

Email: renatoviannafam@hotmail.com

Inventor 4 de 11

Nome: SABRINA DE OLIVEIRA CAPELLA

CPF: 01672031001

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Jacarandás, 717.-Sítio São Marcos

Cidade: Capão do Leão

Estado: RS

CEP: 96160-000

País: BRASIL

Telefone: (53) 981 416207

Fax:

Email: capellas.oliveira@gmail.com

Inventor 5 de 11

Nome: MARIANA TEIXEIRA TILLMANN

CPF: 01097760030

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Avenida Portugal, 1784- Recanto de Portugal

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96083-260

País: BRASIL

Telefone: (53) 991 617200

Fax:

Email: mariana.teixeira.tillmann@gmail.com

Inventor 6 de 11

Nome: EDUARDO NEGRI MUELLER

CPF: 99857464068

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Leonel Mosele, 900, apto 401B, bairro Liberdade

Cidade: Concórdia

Estado: SC

CEP: 89710-153

País: BRASIL

Telefone: (49) 988 706556

Fax:

Email: eduardonmueller@gmail.com

Inventor 7 de 11

Nome: ROGÉRIO ANTÔNIO FREITAG

CPF: 49381199000

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Cidade de Viseu 1462 - Recanto de Portugal

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96083-140

País: BRASIL

Telefone: (53) 981 260060

Fax:

Email: rafreitag@gmail.com

Inventor 8 de 11

Nome: EDUARDO GARCIA FONTOURA

CPF: 00493051074

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Rua Pinheiro Machado - Cidade Alta

Cidade: Alegrete

Estado: RS

CEP: 97543-440

País: BRASIL

Telefone: (55) 996 862202

Fax:

Email: eduardogfontoura@gmail.com

Inventor 9 de 11

Nome: SÉRGIO JORGE

CPF: 14043162804

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Pref. Ary Alcântara, 1000, casa 167, Três Vendas

Cidade: Pelotas

Estado: RS

CEP: 96060-294

País: BRASIL

Telefone: (53) 999 860706

Fax:

Email: sergiojorgevet@hotmail.com

Inventor 10 de 11

Nome: ANTÔNIO GONÇALVES DE ANDRADE JÚNIOR

CPF: 11791495648

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: Rua Alfa, 125, bloco 3, Apto 402, Jardim Riacho

Cidade: Contagem

Estado: MG

CEP: 32241-220

País: BRASIL

Telefone: (31) 984 677088

Fax:

Email: antonio_3@icloud.com

Inventor 11 de 11

Nome: ELIEZER MONTEIRO DA COSTA

CPF: 03617089046

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Graduação

Endereço: General Câmara, 267, apartamento 404

Cidade: Rio Grande

Estado: RS

CEP: 96200-320

País: BRASIL

Telefone: (53) 997 119368

Fax:

Email: eliezerdacosta@hotmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovante de pagamento.pdf
Resumo	Resumo_.pdf
Relatório Descritivo	Relatorio_descritivo.pdf
Reivindicação	Revindicacoes.pdf
Desenho	Desenhos.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Positiva de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, realizado a partir de 30 de junho de 2000, e que foram cumpridas as determinações da Lei 13.123 de 20 de maio de 2015, informando ainda:

Número da Autorização de Acesso: A9B108A

Acesso:

Data da Autorização de Acesso: 25/10/2018

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.