

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



Tese

**Caracterização toxicológica e funcional do extrato aquoso de *Waltheria*
*douradinha***

Eduardo Garcia Fontoura

Pelotas, 2018

Eduardo Garcia Fontoura

Caracterização toxicológica e funcional do extrato aquoso de *Waltheria douradinha*

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 Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Márcia de Oliveira Nobre

Coorientador: Samuel Rodrigues Felix

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F678c Fontoura, Eduardo Garcia

Caracterização toxicológica e funcional do extrato aquoso de *Waltheria douradinha* / Eduardo Garcia Fontoura ; Márcia de Oliveira Nobre, orientadora ; Samuel Rodrigues Felix, coorientador. — Pelotas, 2018.

104 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Douradinha-do-campo. 2. Anti-inflamatório. 3. Otite externa. 4. Wistar. I. Nobre, Márcia de Oliveira, orient. II. Felix, Samuel Rodrigues, coorient. III. Título.

CDD : 636.089

Eduardo Garcia Fontoura

Caracterização toxicológica e funcional do extrato aquoso de *Waltheria douradinha*

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

Data da Defesa: 21/02/2018

Banca examinadora:

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

Prof. Dr. Eduardo Negri Mueller
Doutor em Ciências Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Cristina Gevehr Fernandes
Doutora em Patologia Animal pela Universidade Júlio de Mesquita Filho

Prof^a. Dr^a. Anelize de Oliveira Campello Felix
Doutora em Ciências Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a minha família, pela preocupação, incentivo, apoio e pelo amor que têm comigo durante toda a vida.

À minha noiva Emmanuelle, pela compreensão, confiança, carinho e amor durante essa jornada.

Aos colegas e amigos da pós-graduação, aos alunos colaboradores dos grupos ClinPet e Peterapia, obrigado pelo convívio e auxílio. Tenho certeza de que sem a participação de todos este trabalho não seria possível.

À minha orientadora, professora Márcia de Oliveira Nobre, obrigado pela disponibilidade de me orientar durante toda a jornada na pós-graduação.

À Universidade Federal de Pelotas por me oportunizar a realização do curso de Medicina Veterinária e minha Pós-Graduação.

Aos colegas, funcionários e professores do Programa de Pós-Graduação e Faculdade de Veterinária.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste projeto.

Muito obrigado!

***“O conhecimento nos faz responsáveis”
Che Guevara***

Resumo

FONTOURA, Eduardo Garcia. **Caracterização toxicológica e funcional do extrato aquoso de *Waltheria douradinha***. 2018. 104f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A inflamação do conduto auditivo externo recebe destaque na clínica médica de pequenos animais pelo elevado número de cães que apresentam a doença ao longo de sua vida. Os fatores causadores da otite podem ser descritos como primários predisponentes ou perpetuantes, e as imprudências em seu diagnóstico somadas ao manejo incorreto de medicamentos alopáticos faz com que o índice de animais que apresentam a doença crônica seja elevado. Assim, alternativas ao tratamento convencional são necessárias. A fitoterapia vem crescendo e sendo estimulada, contudo, diversas plantas com potencial medicinal ainda não possuem sua ação comprovada cientificamente, tendo somente recomendações empíricas. A *Waltheria douradinha* é uma planta da família Malvaceae cujas ações ainda não foram completamente desvendadas. As opções de utilização empírica lhe tornam uma escolha para o tratamento de enfermidades inflamatórias. Neste aspecto, associamos a necessidade de comprovação científica da ação da *W. douradinha* no tratamento da otite externa em pequenos animais. Desta forma, nesta tese objetivamos revisar pontos considerados relevantes para a melhor conduta em casos de otite externa, com o intuito de compreender melhor a dimensão desse quadro médico; avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *W. douradinha* através da utilização em ensaio *ex vivo* em globo ocular de frangos, por parâmetros macroscópicos e análise histopatológica; testar o efeito citotóxico *in vitro* causado pela exposição de células ao extrato aquoso de *W. douradinha*; e por fim, avaliar o efeito do tratamento da otite externa infecciosa experimentalmente induzida em ratos wistar, através do uso de extrato aquoso de *W. douradinha*. A avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *W. douradinha* em modelo *ex vivo* utilizou olhos de frango distribuídos em grupos conforme o produto instilado em sua superfície: grupo extrato aquoso de *W. douradinha* 100%, salina 0.9% (Cn) e ácido acético 10% (Cp), foram considerados parâmetros como retenção de fluoresceína, opacidade e inchaço de córnea, além da análise histopatológica. O ensaio citotóxico foi realizado através da exposição de células subcultivadas em placas de 96 poços ao extrato aquoso de *W. douradinha*, após o período de 48 horas foi acrescido o corante de vermelho neutro e se procedeu leitura em espectrofotômetro de placas. Para a observação do tratamento da otite externa, ratos wistar foram induzidos à inflamação através da instilação de óleo de crôton em seus condutos auditivos. Os animais divididos aleatoriamente foram tratados com o extrato aquoso de *W. douradinha* por dois, quatro e seis dias, nas concentrações de 100, 50 e 25%, além de grupo controle contendo solução fisiológica. Os parâmetros de peso e edema da pinna auricular foram avaliados em conjunto com a observação através de vídeotoscópio

do diâmetro da luz do conduto auditivo externo, com sua coloração e efusão, somado a análise histopatológica. Com os resultados, concluiu-se que o extrato aquoso de *W. douradinha* possui um baixo grau de toxicidade perante as análises macroscópicas e histopatológicas realizadas em modelo *ex vivo*, utilizando globo ocular de frangos; o extrato aquoso de *Waltheria douradinha* demonstrou possuir atividade citotóxica nas concentrações de 1, 5 e 10%,; por fim, foram fornecidas evidências de que o extrato aquoso de *W. douradinha* pode ser topicamente ativo para o tratamento da otite externa experimentalmente induzida pelo óleo de cróton em modelo rato.

Palavras-chave: douradinha-do-campo; anti-inflamatório; otite externa; wistar

Abstract

FONTOURA, Eduardo Garcia. **Toxicological and functional characterization of *Waltheria douradinha* aqueous extract**. 2018. 104f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

The inflammation of the external auditory canal is highlighted in the medical clinic of small animals by the high number of dogs that present the disease throughout their life. The causative factors of otitis can be described as primary, predisposing or perpetuating, and recklessness in its diagnosis added to the mismanagement of allopathic drugs causes the index of animals with chronic disease to be elevated. Thus, alternatives to conventional treatment are necessary. Phytotherapy has been growing and being stimulated, however, several plants with medicinal potential do not yet have their action scientifically proven, having only empirical recommendations. *Waltheria douradinha*, is a plant of the family Malvaceae whose actions have not yet been completely unraveled. Empirical options make it a choice for the treatment of inflammatory diseases. In this aspect, we associate the need for scientific verification of the action of *W. douradinha* in the treatment of external otitis in small animals. In this way, this study aimed to review points considered relevant for the best conduct in cases of external otitis, in order to better understand the size of this medical picture; To evaluate the toxicity of the aqueous extract of *W. douradinha* through the use in *ex vivo* test in ocular globe of chickens, by macroscopic parameters and histopathological analysis; to test the *in vitro* cytotoxic effect caused by the exposure of cells to the aqueous extract of *W. douradinha*; and finally to evaluate the effect of experimentally induced infectious external otitis treatment on wistar rats through the use of aqueous extract of *W. douradinha*. The evaluation of the toxicity of the aqueous extract of *W. douradinha* in *ex vivo* model took into account parameters such as retention of fluorescein, opacity and corneal swelling, in addition to the histopathological analysis. The cytotoxic assay was performed by exposing subcultured cells to 96-well plates in the aqueous extract of *W. douradinha*, after 48 hours the neutral red dye was added and a plate spectrophotometer was read. To observe the treatment of external otitis, wistar rats were induced to inflammation through the instillation of chroton oil in their auditory conducts. The randomly divided animals were treated with the aqueous extract of *W. douradinha* for two, four and six days at concentrations of 100, 50 and 25%, in addition to a control group containing physiological solution. The parameters of weight, edema of the auricular pinna were evaluated together with the observation through video otoscopy of the diameter of the light of the external auditory canal, with its coloration and effusion, together with the histopathological analysis. With the results, it was concluded that the aqueous extract of *W. douradinha* has a low degree of toxicity due to the macroscopic and histopathological analyzes carried out in an *ex vivo* model, using a chicken eyeball; the aqueous extract of *Waltheria douradinha* was shown to possess cytotoxic

activity at concentrations of 1, 5 and 10%,; Finally, evidence has been provided that the aqueous extract of *W. douradinha* can be topically active for the treatment of external otitis induced by croton oil in rat model.

Keywords: douradinha-do-campo; anti-inflammatory; otitis external; wistar

Lista de Figuras

Artigo 3

- Figura 1 Leitura de viabilidade células através da incorporação de corante vermelho neutro por células MDBK expostas a diferentes concentrações do extrato aquoso de *Waltheria douradinha*. As barras representam as médias dos valores de absorbância para cada concentração de extrato usada. Os bigodes representam o desvio padrão. A linha pontilhada representa o ponto de corte para considerar não citotóxico (90% do controle). CC representa o controle celular, as demais barras são representadas pela diluição do extrato vegetal e porcentagem. Resultados agregados dos ensaios com células VERO e MDBK..... 73

Artigo 4

- Figura 1 Peso de punch de 8mm de diâmetro do pavilhão auricular de roedores com otite externa induzida, após dois dias (D2), quatro dias (D4) e seis dias (D6) de tratamento com *W. douradinha* a 100% (WD100), 50% (WD50), 25% (WD25), ou solução fisiológica (CT)..... 87
- Figura 2 Espessura do bordo caudal da pinna auricular de roedores com otite externa induzida, após dois dias (d2), quatro dias (d4) e seis dias (d6) de tratamento com *W. douradinha* a 100% (wd100), 50% (wd50), 25% (wd25), ou solução fisiológica (ct)..... 88

Lista de Tabelas

Artigo 1

- Tabela 1 Sensibilidade e resistência a fármacos dos principais agentes microbianos e parasitário envolvidos em casos de otite externa..... 30

Artigo 2

- Tabela 1 Resultados demonstrados pela instilação de extrato aquoso *W. douradinha* (WD1 e WD2), solução fisiológica de NaCl 0,9% (CN) e ácido acético 10% (CP), nos tempos zero (T0) e trinta minutos (T1) em olho de frango para o critério de retenção de fluoresceína sódica. Dados apresentados em escore mediano (escore mínimo – máximo)..... 54
- Tabela 2 Critérios de opacidade e inchaço de córnea nos tempos 30 (T1), 75 (T2), 120 (T3), 180 (T4) e 240 (T5) minutos, após a instilação de solução fisiológica de NaCl 0,9% (CN), ácido acético 10% (CP) e extrato aquoso de *W. douradinha* (WD) em olho de frango. Dados apresentados em escore mediano (escore mínimo – máximo)..... 55
- Tabela 3 Resultados referentes à análise histopatológica dos olhos de frango instilados com extrato aquoso de *W. douradinha* (WD), solução fisiológica de NaCl 0,9% (CN) e ácido acético 10% (CP), para os critérios de lesão em córnea..... 56
- Tabela 4 Determinação da categoria de irritabilidade oftálmica em frangos conforme tabela de escores para os critérios de opacidade de córnea e retenção de fluoresceína..... 57

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão Bibliográfica.....	15
2.1 Otite Externa.....	15
2.2 Plantas Medicinais.....	15
3 Artigos.....	18
3.1 Artigo 1.....	18
3.2 Artigo 2.....	40
3.3 Artigo 3.....	58
3.4 Artigo 4.....	74
4 Considerações Finais.....	89
Referências.....	90
Anexos.....	102

1 Introdução

O sistema auditivo dos animais pode ser descrito por porções externa, média e interna. Contém características únicas como microbiota, pH, temperatura, umidade, entre outras; o ouvido externo torna-se um ambiente propício a alterações danosas, especialmente a otite externa. A otite externa pode ser descrita como a inflamação do conduto auditivo externo, uma das doenças de maior prevalência entre os pequenos animais. São inúmeras formas de desencadeá-la, sendo preferencialmente classificadas como fatores primários, predisponentes ou perpetuantes. Independente do fator desencadeador, na grande maioria das vezes há o acompanhamento de um agente infeccioso, sendo este o alvo principal durante os tratamentos. Os sinais clínicos apresentados pelos animais acometidos vão desde otalgia, odor fétido, presença de cerúmen em excesso, estreitamento da luz do conduto auditivo, balançar de cabeça, eritema, entre outros.

Dificilmente a cronicidade dos casos irá levar o paciente a óbito, contudo a recorrência do quadro pode levar os animais a apresentarem alterações auditivas irreversíveis ou alterações neurológicas. Dentre os métodos de diagnóstico para esta enfermidade podemos citar uma anamnese minuciosa, observação dos sinais clínicos, o exame clínico específico, exames de imagem e análise microbiológica do cerúmen. Como citado anteriormente, muitas vezes os focos do tratamento tornam-se os microrganismos. Contudo, a negligência por parte dos médicos veterinários e proprietários, quanto ao diagnóstico e tratamento corretos, faz com que recidivas não sejam incomuns. Medicamentos alopáticos não raramente são descritos como ineficazes ou incapazes de combater os microrganismos. Desta forma, a pesquisa por um novo tratamento eficiente e com baixos índices de efeitos colaterais se faz necessária.

Desde os primórdios da civilização as plantas são observadas como um componente essencial da alimentação e da manutenção da saúde humana e animal. Muitos registros tratam da utilização das plantas como fitoterápicos por várias gerações. Em muitos países, a utilização de plantas medicinais é incentivada por parte dos órgãos governamentais. Contudo, na grande maioria das vezes a

abrangência da utilização ultrapassa o conhecimento científico sobre o método correto de uso, sendo baseado apenas nas formas empírica e em formas de administração que podem não causar o efeito desejado ou, muitas vezes, causar malefícios a saúde do usuário.

A vasta extensão territorial brasileira faz com que o país receba destaque na quantidade de plantas com potencial medicinal, porém, estima-se que apenas 1% destas seja explorada de forma adequada. O diminuto espaço deste nicho marcado pela presença do Brasil fica nítido quando são confrontados dados onde países como Japão, França e Alemanha tem maior expressão, mesmo apresentando uma biodiversidade menor. Neste espaço, o bioma Pampa aparece de forma única, sendo rico em potencial medicinal. A *Waltheria douradinha* é uma planta amplamente difundida neste bioma, sendo encontrada principalmente em terrenos pedregosos e arenosos. Reconhecida popularmente com o nome de malva-branca, malva-veludo, douradinha ou douradinha-do-campo, esta planta da família Malvaceae já teve isolado em seus constituintes químicos alcalóides, taninos e saponinas. Plantas da mesma família já foram descritas como potenciais alternativas de tratamento para enfermidades humanas. Segundo a medicina popular suas recomendações empíricas descrevem o uso de infusões de casca e folhas para o tratamento de doenças que vão desde hipertensão, alterações do sistema urinário, afecções cutâneas, respiratórias, até diversas doenças inflamatórias.

Com base nisso objetivamos caracterizar de forma toxicológica e funcional a *W. douradinha*, através da utilização de seu extrato aquoso, como estudo preliminar para o possível desenvolvimento de formulação contendo a *W. douradinha*, a qual deve ser capaz de tratar otite externa canina com elevada eficácia.

Visando uma melhor utilização, sem a exposição desnecessária de animais aos nossos testes com extrato aquoso de *W. douradinha*, foi elaborado um plano estratégico através de quatro ensaios experimentais que culminam com os objetivos de revisar pontos considerados relevantes para a melhor conduta em casos de otite externa, com o intuito de compreender melhor a dimensão desse quadro médico; avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *W. douradinha* através da utilização em ensaio *ex vivo* em globo ocular de frangos, por parâmetros macroscópicos e análise histopatológica; testar o efeito citotóxico *in vitro* causado pela exposição de células ao extrato aquoso de *W. douradinha*; avaliar o efeito do tratamento da otite externa

infecciosa experimentalmente induzida em ratos wistar, através do uso de extrato aquoso de *W. douradinha*.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Otite Externa

Considerando as doenças com elevada prevalência na medicina veterinária, é indiscutível a importância da otite externa dentre os pequenos animais. Com base neste aspecto foi formulado o artigo de revisão intitulado “Otite Externa em Pequenos Animais: Artigo de Revisão”, publicado na Revista Científica de Medicina Veterinária. Pequenos Animais e Animais de Estimação, volume 12, páginas 398-404, do ano de 2015. O artigo completo pode ser lido na página 21, sessão “3” deste manuscrito.

2.2 Plantas Medicinais

São inúmeros os relatos da utilização das plantas medicinais durante todo o período de construção da civilização até os dias atuais (FIRMO et al., 2011; OLIVEIRA & MENINI NETO, 2012). No Brasil tais relatos estão associados à cultura indígena, sendo fomentados posteriormente com a vinda de povos africanos e europeus (CACCIA-BAVA et al., 2017). Somado a este conhecimento local, há estimativas de que dois terços das plantas com potencial medicinal do mundo estejam localizados em países de clima tropical, como o Brasil. Este por sua vez conhecido mundialmente por suas riquezas naturais, galgando escalas de ser o país com a maior biodiversidade do planeta (KLEIN et al., 2009; EMBRAPA, 2010). Acredita-se que em todo o território brasileiro existem aproximadamente 200.000 espécies de plantas, sendo que ao menos 50% possuam algum composto ou propriedade com potencial medicinal. Contudo, somente aproximadamente 1% deste nicho é explorado de forma adequada (OLIVEIRA & MENINI NETO, 2012).

2.2.1 *Waltheria douradinha*

Por ser um país com uma vasta extensão territorial, é normal que existam diversificações em sua flora. No território brasileiro são delimitados sete biomas: a Amazônia, o Cerrado, a Caatinga, a Mata Atlântica, o Pantanal, o Manguezal e o Pampa (MACEDO & GEMAL, 2009; EMBRAPA, 2010). Dentre as plantas que compõe o bioma Pampa encontra-se a *Waltheria douradinha*, também chamada de douradinha-do-campo, malva-branca, malva-veludo ou simplesmente douradinha (LORENZI, 2008). De fácil identificação, podemos descrever a douradinha como uma planta com características subarbutiva, ereta ou decumbente. A *W. douradinha* possui folhas alternas, com margens serradas e pilosas, apresenta também inflorescência com flores sésses em glomérulos densos e globosos e com fruto tipo cápsula bivalva. Desenvolve-se em campos de solos arenosos, formando pequenos grupamentos. É uma planta da família Malvaceae, com compostos taninos, flavonoides e saponinas já descritos (SIMÕES et al., 1986; MOREL, 1999; LORENZI & MATOS, 2002; LORENZI, 2008; SCHMIDT et al., 2009; SILVA & CAVALCANTI, 2016).

Em um estudo sobre as principais plantas medicinais comercializadas nos mercados populares, realizado por SILVA & CAVALCANTI (2016), a *Waltheria douradinha* recebe destaque, sendo umas das plantas mais citadas. Suas indicações empíricas englobam ação cicatrizante, antimicrobiana, os tratamentos de reumatismo, gota, doenças da pele, hipertensão arterial, afecções de rins e bexiga, disenteria, doenças do trato respiratório, neoplasias, ação diurética, emagrecedora, antialbuminúrica, cardiotônica, anti-inflamatória e emética (LORENZI & MATOS, 2002; SCHMIDT et al., 2009; LAINETTI & BRITO, 2012; SILVA & CAVALCANTI, 2016). Ainda, em um estudo envolvendo diversos extratos vegetais, a *W. douradinha* obteve os melhores resultados, demonstrando ações como anti-inflamatória, inibidora de proliferação celular, antimicrobiana e ainda baixos índices de toxicidade celular (SCHMIDT et al., 2009). Outro estudo sobre seu potencial antimicrobiano relata sua ação contra bacilos gram-negativos e enterobactérias, além de demonstrar atividade moderada contra trypomastigotas (cepa Y), do *Trypanosoma Cruzy* (BIAVATTI et al., 2002) Uma das características das quinolonas presentes na douradinha é produzir na bactéria a chamada reação de alarme ou resposta, que basicamente consiste na formação de DNA e inibição da

divisão celular. Quando realizada esta etapa o que define pela destruição ou manutenção da célula é o tempo de exposição do DNA ao agente tóxico. Além disso, já houveram comprovações de que todas as reações ocasionadas por estas quinolonas podem levar a reação seguida de morte celular (JACKSON et al., 1998; GRESSLER, 2006), o que comprovaria sua ação antimicrobiana.

Gressler (2006) também demonstrou a presença de ação antimicrobiana de compostos únicos isolados da *W. douradinha* (os alcaloides Waltheriona-A e Waltheriona-B). Este mesmo autor avaliou a ação antioxidante destes compostos, porém separadamente não houveram respostas satisfatórias, mas quando em sinergismo, tais compostos demonstraram boa atividade. Somado a isso, foram identificados compostos de extrema relevância nas plantas estudadas. Foram identificados o (O)-metiltembamida, já utilizado em pesquisas anti-HIV, foi também identificada a Antidesmona (composto com ação anti-trypanossomica), além da descrição de um alcaloide inédito intitulado de VG8, sobre o qual ainda se sabe pouco.

Com base nos dados apresentados, é nítida a escassez de informações sobre as reais formas de ação da *W. douradinha*. As informações publicadas atualmente tratam de estudos *in vitro*, sendo o potencial clínico desta planta ainda pouco explorado.

3 Artigos

3.1 Artigo 1

Otite Externa em Pequenos Animais: Artigo de Revisão

Eduardo Garcia Fontoura; Bruna Daniela dos Santos Valle; Aurélio Luciano Costa; Sabrina de Oliveira Capella; Samuel Rodrigues Félix; Eduardo Negri Mueller; Márcia de Oliveira Nobre

Publicado na Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação
v.12, n.40, p.398-404, 2014

Otite Externa em Pequenos Animais: Artigo de Revisão

External Otitis in Small Animals: Review Article

Eduardo Garcia Fontoura – Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel). E-mail: eduardogfontoura@gmail.com

Bruna Daniela dos Santos Valle – Discente de Medicina Veterinária, UFPel.

Aurélio Luciano Costa – Discente de Medicina Veterinária, UFPel.

Sabrina de Oliveira Capella – Mestranda, PPGV, UFPel.

Samuel Rodrigues Félix – PPGV, UFPel.

Eduardo Negri Mueller – Professor, Instituto Federal Catarinense, Câmpus Concórdia.

Márcia de Oliveira Nobre – Professor Adjunto, Faculdade de Veterinária, Departamento de Clínicas, UFPel.

Resumo

A otite externa é uma doença de elevada incidência na clínica de pequenos animais, acometendo tanto caninos quanto felinos. Sua definição parte da inflamação do epitélio do conduto auditivo externo. Inicialmente os sinais clínicos de eritema, prurido, otalgia, cerúmen em excesso, entre outros, podem passar despercebidos por proprietários e médico veterinário. Em grande parte dos casos o diagnóstico não é considerado um problema, podendo ser concluído através de anamnese, exame clínico geral e específico, porém casos crônicos devem ser considerados e pesquisados de forma mais aprofundada. De modo amplo, o tratamento engloba limpeza, controle da produção de cerúmen e administração tópica de antibacterianos, antifúngicos e anti-inflamatórios, que quando utilizados de forma correta fazem com que ocorra a resolução do quadro. Contudo a negligência ao diagnóstico, aliada ao uso indiscriminado e/ou incorreto do

tratamento vem causando complicações posteriores aos pacientes. Desta forma objetivamos revisar os pontos chave para a melhor compreensão desta enfermidade.

Palavras-chave: orelha externa, conduto auditivo, cães, gatos.

INTRODUÇÃO

O reconhecimento da orelha hígida é de extrema importância para detecção de alterações afim de que se possa estabelecer o protocolo de tratamento adequado quando necessário [1,2]. O conduto auditivo externo em condições normais possui características que mantém o equilíbrio e manutenção adequada de suas funções. Quando em situações de adversidade a incidência de casos otite externa recebe destaque frente a outras otopatias [3].

A otite externa é caracterizada por inflamação do conduto auditivo externo, associado a agentes infecciosos ou não, uni ou bilateral, aguda ou crônica, com exsudato ceruminoso ou purulento [4,5]. A etiologia desta enfermidade pode ser dividida em fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários são propriamente os causadores da inflamação, os fatores predisponentes são mecanismos facilitadores de distúrbios e favorecem o estabelecimento da doença, e por fim, os fatores perpetuantes os quais dificultam a resolução do quadro [6, 7].

O diagnóstico de otite deve ser feito através de anamnese minuciosa, exame clínico, otoscopia e exames complementares como citologia, cultura e antibiograma. Já o tratamento deve incluir o controle da causa primária, como microrganismos, corpo estranho ou dermatopatias [8]. Contudo, a otite externa não é considerada um fator de risco a vida animal, porém a elevada casuística em cães associada a dor intensa causada pelo processo inflamatório, danos ocasionados em longo prazo como a estenose canal auditivo e o desenvolvimento de nodulações, acrescidos do custo do tratamento e demais

dificuldades, fazem com que esta seja uma doença de extrema relevância na clínica médica de pequenos animais [1, 5].

Diante desta situação objetivamos revisar pontos considerados relevantes para a melhor conduta em casos de otite externa, visando maior compreensão da dimensão desse quadro pelo médico veterinário, assim como o bem-estar de seus pacientes.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Anatomia e conformidades da orelha externa

A orelha pode ser dividida em três regiões: orelha externa, média e interna. O ouvido externo por sua vez é dividido em pina (pavilhão externo) e meato acústico externo (porção vertical e horizontal) até a separação do ouvido médio pela membrana timpânica [2,7]. A principal função do ouvido é transformar as ondas sonoras em mensagens neurais para interpretação do sistema nervoso, e também atuar no controle do equilíbrio, este exercido pelo ouvido interno [10]. Em cães, cada raça possui suas particularidades quanto à conformação do pavilhão externo, podendo ser pendular, semi-pendular ou ereto [7]. A maioria dos felinos possui o pavilhão auricular externo ereto, porém modificações genéticas estão fazendo com que surjam variações neste aspecto [2].

1.2 Microclima do conduto auditivo

O ouvido externo possui características únicas que formam um ambiente normal onde estão presentes microrganismos comensais, pelos, glândulas sebáceas e apócrinas, que interferem diretamente na aeração, pH, temperatura [4,5]. Estes fatores podem ser influenciados de diversas formas, a raça do animal é um exemplo clássico onde se pode

notar alterações na conformação da orelha externa, quantidade de glândulas e na quantidade e densidade de folículos pilosos [2,7,10].

Cães com orelhas pendulares são mais propensos a infecções de ouvido que cães com orelhas eretas, independente destes últimos terem maior quantidade de folículos pilosos no conduto auditivo ou não [7]. Ainda, os animais que agregam características como orelha pendular, maior quantidade de folículos pilosos ou canal auditivo reduzido de diâmetro, conseqüentemente diminuem a aeração local, fazendo com que haja aumento da temperatura e umidade. Este fato favorece o crescimento de microrganismos oportunistas e, conseqüentemente a ocorrência de infecções. A umidade, tanto do conduto auditivo externo como do ambiente, já foi descrita como fator predisponente para otite externa [6]. Também podemos citar o pH do epitélio do conduto auditivo, uma orelha sadia deve conter o pH entre 4,6 e 7,2, quando em casos de otite externa aguda este pH sofre alcalinização moderada, elevando o pH conforme a cronicidade do quadro [7]. Em situações de pH alcalino há o favorecimento do crescimento de microrganismos que normalmente não causariam dano [2].

O cerúmen, caracterizado por ser a emulsão das secreções glandulares em conjunto com células epiteliais, também é um fator influente nestes casos. A orelha sadia possui cerúmen em pequenas quantidades formando uma barreira protetora, este por sua vez também age como antimicrobiano deixando o pH baixo [2,7]. Contudo o pH do conduto auditivo também pode alcalinizar conforme aumentar a secreção de cerúmen [7].

Por fim, o conduto auditivo externo possui microrganismos que se mantêm sob controle em circunstâncias normais, porém casos em que haja o favorecimento de seu crescimento e multiplicação a *Malassezia pachydermatis* e *Staphylococcus intermedius* [4,8], ou *Staphylococcus pseudintermedius*, segundo a classificação de DEVRIESE et al. [9], podem tornar-se patogênicos [4,8].

1.3 Otite externa

A otite externa caracteriza-se por inflamação do conduto auditivo externo, podendo ser de etiologia infecciosa ou não [11,12], uni ou bilateral, aguda ou crônica e seu exsudado ceruminoso ou purulento [13]. É uma doença de elevada prevalência na rotina clínica de pequenos animais, sendo que aproximadamente 20% dos cães encaminhados ao atendimento apresentem sinais clínicos [8,14]. Porém, muitas vezes esta enfermidade pode ser negligenciada ou posta em segundo plano, tanto pelo médico veterinário quanto pelo proprietário, tornando-se um desafio de diagnóstico e tratamento [1,5].

1.3.1 Etiologia

A otite é uma doença comum em caninos, mas também pode estar presente em felinos, sendo que nestes a maior ocorrência da doença é de origem parasitária [15]. Diversos fatores podem desencadear a inflamação da orelha externa, podendo ser divididos em fatores predisponentes, primários e perpetuantes. Para o sucesso do tratamento é essencial à identificação do fator desencadeante da doença [8,12].

1.3.2 Fatores primários

São estes fatores que desencadeiam a doença. A identificação e tratamento dos fatores primários são essenciais para que haja resolução do quadro clínico [8,11]. Nesta categoria encontram-se causas parasitárias, as quais são a principal forma desencadeante de otite em felinos podendo chegar a 50% dos casos. Os principais ácaros para a clínica de pequenos animais compreendem o *Otodectes cynotis*, o *Demodex canis*, o *Otobius megnini*, o *Sarcoptes scabiei*, o *Notoedres cati*, o *Cheyletiella spp.*, e *Eutrombicula sp.* Ainda neste grupo estão as doenças autoimunes, doenças endócrinas, assim como hipersensibilidade e doenças alérgicas, neoplasias e corpos estranhos [6]. As

hipersensibilidades e alergias são relatadas como a maior causa de otite crônica ou recorrente em cães, indicando que respectivamente 55% e 80% dos cães com dermatite atópica e alergia alimentar apresentam otite externa concomitante [12].

1.3.3 Fatores predisponentes

As causas predisponentes são aquelas que não iniciam diretamente a otite externa, porém aumentam o risco da ocorrência da doença. Muitos destes fatores alteram o microclima auditivo normal, que, associado a outros fatores primários irão causar a otite externa [6,11]. Neste grupo destacam-se principalmente causas relacionadas à anatomia e genética. Exemplos são cães com orelhas pendulares, excesso de pelos e/ou estenose do conduto auditivo, entre outros, que fazem com que haja dificuldade de drenagem e aeração no conduto auditivo [12].

Sabe-se que cães das raças Poodle, Cocker Spaniel Inglês, Fila brasileiro, Pastor alemão, entre outras, possuem maior predisposição ao desenvolvimento de otite, ainda que a incidência em cães sem raça definida também seja elevada [4]. Também, excesso de umidade no conduto auditivo pode ser um fator predisponente a otite externa, essa por sua vez age macerando o epitélio diminuindo assim a barreira protetora contra infecções. Ainda, tratamentos utilizados de forma errônea, ou até mesmo a limpeza inadequada, podem ocasionar lesões no epitélio auricular [6,12,16].

1.3.4 Fatores perpetuantes

Este grupo abrange as causas que não desencadeiam diretamente a doença no conduto auditivo, mas dificultam sua resolução. São causas que devem ser tratadas concomitantemente com a afecção primária ou não haverá resolução do quadro. Pode-se

utilizar como exemplo, causas de origem bacteriana, fúngica, obstruções ou estenose do conduto auditivo assim como quadros de otite média [6,12].

As características do conduto auditivo permitem a presença de microrganismos, porém, tais condições fazem com que ocorra um equilíbrio em seu crescimento e mecanismos de patogenicidade, tornando-os não patogênicos ou menos virulentos temporariamente, até que ocorra algum distúrbio que favoreça seu desenvolvimento [8]. Dentre os microrganismos mais comumente isolados em casos de otite externa estão as leveduras *Malassezia pachydermatis*, assim como as bactérias *Staphylococcus intermedius* ou também descrito atualmente como *S. pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* spp, *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli* e *Corynebacterium* sp. [4, 5, 8,9, 12, 13, 14].

1.3.5 Sinais clínicos

Sinais clínicos como prurido, quando em fase inicial, podem passar despercebidos tanto pelo proprietário quanto pelo médico veterinário, principalmente em casos em que o paciente chega ao médico veterinário para a pesquisa de outra enfermidade [1,5]. Os sinais clínicos característicos compreendem além do prurido, dor a palpação e/ou incomodo, pender ou balançar a cabeça, exsudação ceruminosa ou purulenta, eritema, edema, ulcerações, odor fétido, sendo que também podem ser visualizados na porção externa da orelha sinais de escoriações e auto-traumas. Nos casos de maior cronicidade estes sinais clínicos também podem cursar com estenose do canal auditivo e dificuldade ou perda de audição, este último, em quadros com envolvimento da orelha média [6,12].

Casos com origem parasitária ou por corpos estranhos geralmente iniciam de forma aguda através de prurido intenso, podendo ser diferenciados pela quantidade

menor de exsudato no período inicial, principalmente o exsudato ceruminoso que mais comumente é observado em otites por alterações autoimunes ou glandulares [16].

1.3.6 Diagnóstico

Para o diagnóstico da otite externa uma anamnese minuciosa é sempre importante. Perguntas como tempo de evolução do quadro, progressão, outros tratamentos ou outras áreas do corpo afetadas devem estar sempre presentes visando à pesquisa por uma possível causa primária ou dificuldades de tratamento [11]. Ainda, o médico veterinário deve lançar mão do exame clínico geral e específico através da otoscopia, podendo ser auxiliado por exames complementares, como cultura, antibiograma, citologia auricular, biopsia, estudo radiológico [11,12,16] além de vídeotoscopia [3], tomografia, ressonância magnética ou também otoscopia virtual 3D, a qual permite navegação por imagem ao longo das superfícies internas de um modo semelhante à vídeotoscopia convencional [17]. Porém, com o uso somente da otoscopia o clínico já pode detectar a presença de corpos estranhos, neoplasias, classificar o grau de eritema na região auricular, avaliar as lesões progressivas que acompanham o quadro, entre outras observações consideradas relevantes. GOTTHELF [18] faz associações entre o possível agente causador da otite e a coloração do exsudato produzido e visualizado na otoscopia. Casos relacionados a *Malassezia* sp. apresentariam exsudato de coloração amarronzada, casos onde há o envolvimento de *Pseudomonas* sp. podem demonstrar exsudato purulento levemente esverdeado, assim como casos de otite relacionados com *Staphylococcus* sp. estão mais associados ao exsudato amarelado.

1.3.7 Tratamento

Para um tratamento efetivo a identificação do agente primário causador da doença é extremamente importante [12]. Porém de maneira geral os alvos terapêuticos de maior foco tornam-se os microrganismos [8]. Contudo, independente do fator causador, a limpeza do conduto auditivo deve ser sempre levada em consideração como auxiliar ao tratamento, principalmente por permitir a ação de outros princípios na parede do conduto auditivo [19].

O uso de ceruminolíticos é realizado como tratamento conjunto da otite externa, atuando na limpeza do canal auditivo sempre antecedendo a aplicação de fármacos [20, 21]. O propilenoglicol é um álcool orgânico, viscoso, incolor, solvente e emulsificante, sendo considerado uma substância de baixa irritabilidade, e em algumas concentrações também podendo atuar com ação queratolítica. Por essas características, o propilenoglicol é utilizado amplamente como veículo para formulações de produtos da linha dermatológica e soluções otológicas [19,22]. A aplicação do ceruminolítico pode reduzir alguns dos sinais clínicos, principalmente o odor fétido na concha acústica e quantidade de cerúmen visualizado na otoscopia, embora ele não apresente uma ação antimicrobiana direta, pode levar a uma redução dos microrganismos de forma indireta, pela redução do cerúmen, utilizado como substrato para a multiplicação e crescimento bacteriano [23].

Contudo a grande maioria das formulações otológicas contêm antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatórios e pequenas quantidades de anestésicos locais [24], porém o uso de medicamentos tópicos em casos rompimento da membrana timpânica pode causar reações indesejáveis. Por exemplo, a antibioticoterapia com base nos aminoglicosídeos é contraindicada em casos de perfuração da membrana timpânica, sendo considerada ototóxica, assim, em casos que se desconheça o estado de integridade da membrana timpânica são aconselhados o uso de quinolonas como a

ciprofloxacina ou ofloxacina [25]. O tratamento utilizando medicamentos sistêmicos é indicado quando houver otite externa com sinais clínicos exacerbados, otite crônica ou também casos de otite média, sendo que o tratamento se estende mesmo após a cura clínica [26].

A escolha do antimicrobiano sempre deve ser baseada em testes de sensibilidade e cultura. Casos de otite média não devem ser resolvidos somente com a terapia tópica, sendo necessário o uso sistêmico concomitante [26]. Antibióticos que penetrem o tecido fibroso ou calcificado devem ser administrados em doses mais elevadas, como por exemplo, a sulfadizina associada com trimetoprim a cada 12 horas (BID), clindamicina ou enrofloxacin, ambos BID. Este tratamento pode se estender por seis a oito semanas, sendo indicada a continuidade da terapia por sete dias após o desaparecimento dos sinais clínicos [27].

Também existem casos específicos onde o tratamento pode possuir maior efetividade sob determinado microrganismo, como por exemplo, os aminoglicosídeos, especialmente a gentamicina, que são efetivos principalmente na redução de bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. [28]. Porém Lorente [29] relata que já existem casos onde há a redução da ação como bactericida contra esse gênero bacteriano. Outro exemplo é a ciprofloxacina que pode ser empregada como um antibiótico ativo contra a maioria dos microrganismos, mas com ação principalmente sobre *P.aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, as quais são bactérias de importância nesta enfermidade, e como aditivo a ciprofloxacina ainda apresenta baixo índice de efeitos colaterais, além de não causar absorção sistêmica após aplicação tópica, ao contrário dos aminoglicosídeos que causam ototoxicidade, sendo que já foi demonstrada que a administração tópica de ciprofloxacina obtém melhores resultados que a administração de gentamicina sistêmica [29].

Ainda sobre a *P. aeruginosa*, este microrganismo está sendo considerado problemático em termos de tratamento, pois nos últimos anos é crescente o número de

cepas resistentes. Estudos *in vitro* estão sendo realizados para resolver este problema, alguns resultados já demonstram que a utilização de polimixina B associada à miconazol tem potencial de ação capaz de ser utilizada na maioria das cepas, principalmente em casos de resistência a enrofloxacin e gentamicina [28,30]. A *P. aeruginosa* também já desenvolveu resistência há maioria das penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cloranfenicol e a alguns aminoglicosídeos (estreptomicina, neomicina e canamicina), tetraciclina e sulfonamidas. Contudo antibióticos como ureidopenicilinas, quarta geração de cefalosporinas, quinolonas e polimixinas, ainda podem ser usados para tratar as infecções por *P. aeruginosa* [31].

Penna [32] alerta sobre espécies do gênero *Staphyococcus* (*S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. simulans*) as quais apresentam resistência pelo menos há um antimicrobiano, sendo a grande maioria multirresistente. Estas bactérias já demonstram algum grau de resistência a amoxicilina quando utilizada sozinha, assim como também há a demonstração de queda da eficácia das penicilinas. Nestes casos a utilização de amoxicilina associada ao ácido clavulânico ou oxacilina é considerada eficaz, enquanto a neomicina e eritromicina já demonstram um alto índice de resistência, não devendo ser empregadas. Fatos como estes demonstram a necessidade da cultura bacteriana para identificação de espécies e testes de susceptibilidade aos antimicrobianos (antibiogramas) para a terapêutica adequada (Tabela 1) [32].

Nas otites, as infecções micóticas superficiais são causadas por leveduras principalmente dos gêneros *Malassezia* spp., ou de forma mais rara *Candida* spp. Estes microrganismos podem atuar como habitante natural da pele e ouvido dos cães, ou também como patógeno oportunista. Essas formas de infecção fúngicas relatadas em animais domésticos acometem a epiderme, o epitélio folicular, a haste pilosa [33]. Conforme Bensignor [34] os tratamentos utilizando miconazol proporcionam a redução fúngica desejada, embora tratamentos com associação de antifúngico, antimicrobiano e

anti-inflamatório, como respectivamente: clotrimazol, marbofloxacina e dexametasona produzam uma maior efetividade na redução de eritema, cerúmen e prurido.

A *M. pachydermatis* é uma levedura frequentemente envolvida como fator perpetuante na otite externa. As terapias tópicas com diferentes agentes antifúngicos são geralmente bem sucedidas para o controle de seu crescimento. Apesar das repetições de tratamento com os mesmo princípios antifúngicos, a *M. pachydermatis* não demonstrou ainda suscetibilidade de desenvolver mecanismos de resistência com relevância clínica. Atualmente os antifúngicos mais utilizados são os azóis, representados principalmente pelo miconazol e clotrimazol [15,35].

Tabela 1. Sensibilidade e resistência a fármacos dos principais agentes microbianos e parasitário envolvidos em casos de otite externa.

Agente	Resistente	Sensível
<i>Otodectes</i>	-----	Ivermectina
<i>Pseudomonas</i> sp.	Beta-lactâmicos	Aminoglicosídeos (gentamicina, ciprofloxacina, polimixina associado a miconazol)
<i>Staphylococcus</i> sp.	Neomicina, Eritromicina	Ciprofloxacina, Amoxicilina associada a Ác. Clavulânico, Oxacilina
<i>Malassezia</i> spp.	Cetoconazol (resistência intermediária)	Miconazol, Clotrimazol, Marbofloxacina

Para animais com otite com causa primária parasitária, como os acometidos por *Otodectes*, o uso sistêmico de ivermectina é considerado a forma mais eficaz de tratamento, sendo recomendado para os animais em conjunto com o controle ambiental [27]. Especialmente cães da raça Collie e mestiços, não devem ser tratados com ivermectina, sendo que cães da raça Old English Sheepdogs e Shetland Sheepdogs também necessitam de maiores cuidados durante a administração de medicamentos com este princípio. Ainda, nas preparações otológicas veterinárias é comum o uso de piretrinas, carbaril, tiabendazol, organofosforados e monossulfiram [24,36]. O fipronil é uma molécula sintética com atividade comprovada contra ácaros e insetos, além de não ser tóxica quando utilizada em filhotes, podendo ser empregada como alternativa de tratamento [27].

A grande maioria dos casos de otite externa pode ser solucionada com a utilização de terapia tópica, quando respeitados critérios de administração, principalmente o período de tratamento [24]. Porém, são inúmeros os casos de negligência durante o tratamento de otite, o que pode resultar em recidiva e evolução para casos crônicos, fato que eleva resistência bacteriana, custo de tratamento e, muitas vezes, culminam com a necessidade de procedimentos cirúrgicos para resolução do quadro [1, 6, 16]. Segundo Voget [37] a antibioticoterapia errônea além de causar resistência, quando utilizado em doses ou períodos reduzidos, também pode ao final do tratamento alcançar concentrações plasmáticas elevadas, ultrapassando o limite de determinação para o tratamento. Mais que isso, a utilização das mesmas moléculas para o tratamento humano e animal faz com que haja uma dificuldade no controle dos medicamentos [5,8]. Por esse motivo a terapia deve ser escolhida de forma consciente a aperfeiçoar o tratamento e minimizar o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos convencionais.

Estudos *in vivo* com modelos experimentais estão sendo realizados para melhor reproduzir as condições de ocorrência desta doença assim como seu tratamento. Assim

espera-se em um futuro próximo afirmar a capacidade real de novos compostos e também os de melhor ação para o tratamento desta enfermidade [39, 40].

Considerações finais

Diversos fatores podem desencadear a otite externa, cabe ao médico veterinário identificar a doença mesmo quando não houver queixa. Com o diagnóstico no período inicial da doença o tratamento deve ser instituído de forma adequada e específica ao agente causador da doença para que assim não haja evolução e recidiva.

Abstract

Recognition of normal ear is extremely important to detect changes and thus establish the correct treatment protocol that succeeds in each specific pathology when necessary. Otitis externa is a disease of high prevalence in the clinic for small animals, affecting both dogs when felines, their definition of the inflammation of the epithelium of the external auditory canal. Initially, the clinical signs may go unnoticed by owners and veterinarian, which presents with erythema, itching, earache, excessive cerume, among others. In most cases the diagnosis is not considered a problem, and may be completed through anamnesis, general and specific clinical examination, but chronic cases should be considered and investigated more deeply. Broadly, the topical treatment encompasses antibacterial, antifungal and anti-inflammatory, which when used correctly cause occurs the condition is resolved, but the neglect of diagnosis, coupled with the indiscriminate use or misuse of the treatment is causing complications subsequent to patients. Thus we aim to review the key points for a better understanding of this disease.

Keywords: External ear, ear canal, dogs, cats.

Agradecimentos: A CAPES e ao CNPq pela concessão de bolsas e incentivo ao ensino e pesquisa (Processo CNPq: 305072/2012-9).

Referências

- [1] GRIFFIN, C. E. Otitis Techniques to Improve Practice. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.21, p.96-105, 2006.
- [2] NJAA, B. L.; COLE, L. K.; TABACCA, N. Practical Otic Anatomy and Physiology of the Dog and Cat. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.42, p. 1109-1126, 2012.
- [3] MANISCALCO, C. L.; AQUINO, J. O.; PASSOS, R. F. B.; BÜRGER, C. P.; MORAES, P. C. Emprego da vídeo-otoscopia no diagnóstico de otite externa em cães. **Ciência Rural**, v.39, n.8, p.2454-2457, 2009.
- [4] NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from rio grande do sul state, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p.245-249, 2001.
- [5] MALAYERI, G. Z.; S. JAMSHIDI; SALEHI, T. Z. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Communications**, v.34, 435-444, 2010.

[6] NASCENTE, P. S.; CLEFF, M. B.; ROSA, C. S.; SANTOS, D. V.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO J. R. B. Otite externa em pequenos animais: uma revisão. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.4, n.11, p.52-59, 2006.

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

[8] LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. **Journal Veterinary Medicine**. n.54, p. 559–563, 2007.

[9] DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; GRAEF, E.D.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. Nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. n. 55, p. 1569-1573, 2005.

[10] HEINE, P. A., Anatomy of the ear. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.34, p. 379-395, 2004.

[11] MURPHY, K. M. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.16, p.236-241, 2001.

- [12] ROSSER, E. J. Jr., Causes of otitis externa. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. n.34, p.459–468, 2004.
- [13] MUELLER, E. N.; GUIOT, Ê. G.; TILLMANN, M. T.; CAMPELLO-FELIX, A. O.; PEREIRA, I. C.; SCHRAMM, R. C.; NOBRE, M. O. Avaliação do efeito da lavagem do canal auditivo externo em orelhas com otite externa purulenta bilateral. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.9, n.28, 147-150, 2011a.
- [14] PENNA, B.; THOMÉ, S.; MARTINS, R.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. In vitro ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in rio de janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. n.42, p.1434-1436, 2011.
- [15] BAPTISTA, T. C. C.; REIS, C. R.; TEIXEIRA, D. R.; MOURA, M. Diagnóstico de *Malassezia* sp em ouvidos de cães e sua correlação clínica. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v.09, n.09, p.48-55, 2010.
- [16] LINZMEIER, G. L.; ENDO, R. M.; LOT, R. F. E. Otite externa. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. ano VII, n.12, 2009.
- [17] CHO, Y.; JEONG, J.; LEE, H.; KIM, M.; KIM, N.; LEE, K. Virtual otoscopy for evaluating the inner ear with a fluid-filled tympanic cavity in dogs. **Journal of Veterinary Science**. v.13, n.4, p.419-424, 2012.

- [18] GOTTHELF, L. N. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. **The veterinary Clinics Small Animal Practice**. V.34, n. 2, p.469-487, 2004.
- [19] NUTTALL, T.; COLE, L.K. Ear cleaning: the UK and US perspective. **Veterinary Dermatology**, v.15, n.2, p.127-136, 2004.
- [20] MUELLER, E. N.; GUIOT, E. G.; SANTIN, R.; MEIRELES, M. C. A.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O. Efeito auxiliary do ceruminolítico na terapia tópica de cães (*canis lupus familiaris*) com otite externa ceruminosa. **Ciência Animal Brasileira**. N.1, v.14, p.59-64, 2013.
- [21] BASSETT, R. J.; BURTON, G. G.; ROBSON, D. C.; HEPWORTH, G. Efficacy of an acetic acid/boric acid ear cleaning solution for treatment and prophylaxis of *Malassezia* sp. otitis externa. **Australian Veterinary Practitioner**, v.34, n.2, p. 79-82, 2004.
- [22] GELLER, M.; FILHO, A. B.; CUNHA, K. S. G., SLAIBI, E. B.; ABREU, C. S.; BARBOSA, J. S. S. Avaliação imunodermatológica da resposta ao propilenoglicol e ao butilenoglicol - revisão bibliográfica sistemática. **RBM: Revista Brasileira de Medicina**, v.67, n.7, p.234-239, 2010.
- [23] MUELLER, E. N.; GUIOT, E. G.; WILHELM, G.; FERNANDES, C. P. M.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O. Otite externa ceruminosa e purelenta em cães. **A Hora Veterinária**, v.30, n.179, p.38-40, 2011b.

[24] SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears. In: **MULLER & KIRK'S SMALL ANIMAL DERMATOLOGY**. 6.ed., p.1204-1231, Philadelphia: Editora W.B. Saunders Company, 2001.

[25] KAUSHIK, V.; MALIK, T.; SAEED, S. R. Interventions for acute otitis externa. **Rev Port Med Geral Fam**. V. 28, p. 234-236, 2012.

[26] MORRIS, D. O. Medical therapy of otitis externa and otitis media. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. V. 34, p. 541-555, 2004.

[27] LEITE, C.A.L. Terapêuticas tópica e sistêmica: pele, ouvido e olho. In: **Manual De Terapêutica Veterinária**. 3.ed., p.168-179, São Paulo: Editora Roca, 2008.

[28] MEKIC, S.; MATANOVIC, K.; SEOL, B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Record**. V.30, n.5 p.125-169, 2011.

[29] LORENTE, J.; SABATER, F.; RIVAS, M.; FUSTE, J.; RISCO, J.; GÓMEZ, M. Ciprofloxacin plus fluocinolone acetonide versus ciprofloxacin alone in the treatment of diffuse otitis externa. **The Journal Of Laryngology & Otology**. V. 128, n.7, p.591-598, 2014.

- [30] PIETSCHMANN, S.; MEYER, M.; VOGET, M.; CIESLICKY, M. The Joint in vitro action of polymyxin B and miconazole against pathogens associated with canine otitis externa from three European countries. **Veterinary Dermatology**. V. 24, n.4, p 439-45, 2013.
- [31] GIGUÈRE, S. Antimicrobial Drug Action and Interaction: Na Introduction. **Antimicrobial therapy in veterinary Medicine**. 4th. S Giguère, JF Prescott, JD Baggot, RD Walker and PM Dowling, eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 2006.
- [32] PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G. M.; MARTINS, R.; LILENBAUM, W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**. V.21, p. 292-296, 2009.
- [33] FARIAS, M.R. Terapêutica otológica. In: **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.
- [34] BENSIGNOR, E.; GRANDEMANGE, E. Comparison of an antifungal agent with a mixture of antifungal, antibiotic and corticosteroid agents for the treatment of Malassezia species otitis in dogs. **The Veterinary Record**. V.158, p. 193-195, 2006.
- [35] CHIAVASSA, E.; TIZZANI, P.; PEANO, A. In vitro antifungal susceptibility of malassezia pachydermatis strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa. **Mycopathologia**. V.178, n. 3-4, p.315-319, 2014.

[36] ROSYCHUK e LUTTGEN, Olhos, ouvidos, nariz e garganta. In: **TRATADO DE MEDICINA INTERNA VETERINÁRIA DOENÇAS DO CÃO E DO GATO**. 5.ed., p. 1048-1056, Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2005.

[37] VOGET, M.; ARMBRUSTER, M.; MEYER, M. Antibiotic plasma levels in dogs with otitis external treated routinely with various tropical preparations. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**. V.125, n.11-12, p. 441-448, 2012.

[38] MUELLER, E. N. **Avaliação e tratamento da otite externa canina**. 91f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.

[39] FONTOURA, E. G. *Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no tratamento da otite externa infecciosa. 50f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

[40] TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L. E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S. M.; DINIZ, S. P.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.4, p.741-746, 2008.

3.2 Artigo 2

Ensaio toxicológico do extrato aquoso de *Waltheria douradinha* (douradinha do campo) em modelo *ex vivo*

Eduardo Garcia Fontoura; Samuel Rodrigues Félix; Ciciane Pereira Marten; Fabiane Borelli Grecco; Victoria de Moraes Gonçalves; Anelize Campello Felix; Márcia de Oliveira Nobre

Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório
v.2, n.4, p.264-272, 2014

ARTIGO ORIGINAL

Ensaio toxicológico do extrato aquoso de *Waltheria douradinha* (douradinha do campo) em modelo *ex vivo*

Eduardo Garcia Fontoura¹; Samuel Rodrigues Felix¹; Ciciane Pereira Marten Fernandes¹; Fabiane Borelli Grecco²; Victoria de Moraes Gonçalves³; Anelize Campello Felix⁴; Márcia de Oliveira Nobre¹

¹Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel). ²Departamento de Patologia, Faculdade de Veterinária, UFPel. ³Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Instituto de Química e Geociência, UFPel. ⁴Biotério Central da UFPel, Faculdade de Veterinária, UFPel.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA: Eduardo Garcia Fontoura –
eduardogfontoura@gmail.com

DATA RECEBIMENTO: 21/07/2014

ACEITO PARA A PUBLICAÇÃO: 01/08/2014

RESUMO

A produção de fitoterápicos exige que em seu desenvolvimento haja testes em relação a sua toxicidade. Assim métodos que promovam a redução de animais em pesquisa devem ser aplicados também a estes compostos. AOECD (*Guideline for the Testing of Chemicals*) recomenda o teste do olho de frango como uma alternativa de triagem, antes de levar os produtos à ensaios *in vivo*. Os objetivos deste estudo foram determinar a toxicidade do extrato aquoso de *Waltheria douradinha* através de ensaio *ex vivo* em globo ocular de frangos, e demonstrar dados que justifiquem a utilização deste como teste de triagem anterior ao ensaio *in vivo*. Foram utilizados olhos de frangos *ex vivo*, distribuídos em grupos conforme o produto instilado em sua superfície: grupo extrato aquoso de *W. douradinha* (WD), salina 0,9% (CN) e ácido acético 10% (CP). A toxicidade foi avaliada para retenção de fluoresceína, opacidade e inchaço de córnea, e critérios histopatológicos, conforme recomendação da OECD. O grupo WD demonstrou

resultados macroscópicos com baixo índice de irritabilidade, quando comparados com os olhos CP ($P < 0,05$). Ainda, os olhos WD demonstraram menores alterações histopatológicas que os olhos CP, estando, em todas as ocasiões, com índice não irritante. Nas condições deste estudo concluímos que o extrato aquoso de *W. douradinha* possui baixo grau de toxicidade perante as análises macroscópicas e histopatológicas. Mais que isso, indicamos o teste do olho da galinha como ensaio de triagem para determinação da toxicidade de fitoterápicos, podendo ser usado antes de levar os extratos à teste em animais, reduzindo assim o uso destes.

Palavras-chave: Testes alternativos. Fitoterápicos. *Draize*. Toxicologia ocular. Validação.

Toxicological assay with aqueous extract of Waltheria douradinha (douradinha do campo) in ex vivo model

ABSTRACT

Requirements for the toxicological assessment of phytotherapies are increasing, as these become more widespread. Methods that reduce the animals used in these toxicology studies should also be applied for these compounds. The enucleated chicken eye test is recommended by OECD as an early screening method, used prior to the *in vivo* assays. The objectives of this study were to assess the toxicity of the aqueous extract of *Waltheria douradinha* through the enucleated chicken eye test, as recommended by the OECD, and demonstrate evidence supporting it as a valid screening assay. The eyes of commercially slaughtered chicken were used in this study, these were divided into groups according to the product instilled: aqueous extract of *W. douradinha* (WD); 0.9% saline (CN); and 10% acetic acid (CP). Toxicity was evaluated by predetermined criteria for fluorescein retention, corneal opacity, and swelling, in five time points. Histopathological criteria for corneal lesions were also assessed. Throughout the study the WD group showed low rates of irritability compared with CP eyes ($P < 0.05$) in the macroscopic criteria. Moreover, WD eyes showed lower histopathological changes than CP eyes, and were characterized as non irritant. In this study we conclude that the aqueous extract of *W. douradinha* has a low degree of toxicity, as shown by both macroscopic and histopathological parameters. Furthermore, we recommend the enucleated chicken eye test as a screening assay to determine the

toxicity of herbal extracts, and should be used before *in vivo* testing, thus reducing the number of animals used.

Key Words: Alternative tests. Herbal. *Draize*. Ocular toxicology. Validation.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são importantes recursos terapêuticos utilizados de forma empírica há milhares de anos para prevenção e tratamento de inúmeras doenças¹. Na atualidade, sua utilização é comum e faz parte da cultura popular sendo fomentada principalmente nas nações em desenvolvimento², onde parte da população tem pouco acesso à medicina formal. Atualmente, diversos campos da pesquisa têm se voltado para a confirmação e análise de componentes referentes ao potencial farmacológico das plantas em busca de uma utilização mais segura¹. Porém, o vasto uso sem o conhecimento prévio de seus compostos bioativos, aliado ao pensamento errôneo sobre produtos *in natura*, faz com que ocorra a ausência da resposta pretendida, ou ainda a ocorrência de efeitos colaterais^{3,4}.

A biodiversidade de plantas brasileiras é vasta e ainda pouco explorada, portanto há a necessidade de se obter um mapeamento etnofarmacológico e toxicológico mais detalhado dos biomas existentes em território brasileiro⁴. Entre as plantas brasileiras de interesse medicinal encontra-se a *Waltheria douradinha* (douradinha do campo), uma planta arbustiva e rasteira do bioma Pampa^{5,6}. Os extratos aquosos e lipofílicos dessa planta já foram descritos como ricos em compostos bioativos^{7,8}. Ainda, em um estudo *in vitro*, realizado com plantas triadas como promotoras da cicatrização, a douradinha do campo se mostrou particularmente eficiente, sendo promissor tanto seu extrato aquoso como o lipofílico⁹. A *W. douradinha* brasileira é semelhante filogeneticamente à *W. indica* (sinônimo de *W. americana*), comum à varias partes do mundo, com diversas ações farmacológicas já descritas, incluindo ação cicatricial, antitérmica e anti-inflamatória¹⁰.

A fim de tornar a utilização de fitoterápicos uma alternativa segura na prevenção e combate de doenças, deve-se submetê-los a testes pré-clínicos de irritabilidade e toxicidade conforme recomendado pela legislação¹¹. Com o intuito de realizar uma menor exposição e utilização desnecessária de modelos animais em pesquisa, os ensaios de citotoxicidade *in vitro* e toxicidade *ex vivo*, estão sendo adotados como rotina e

postos a prova como alternativa^{2, 12-14}. O teste de *Draize*, ensaio pré-clínico em olhos de coelhos *in vivo*, há muito é realizado para produtos com a finalidade de avaliar o potencial irritante antes de sua comercialização^{15, 16}. Como alternativa, a utilização de material oriundo de abatedouros vem tornando-se cada vez mais indicada. O globo ocular de frangos abatidos para consumo é uma opção eficaz que reproduz fielmente os parâmetros analisados nos testes de toxicidade *in vivo* para soluções aquosas, sendo utilizado principalmente na fase de testes para produtos que se pressupõe que possuam elevado grau de irritabilidade, e desta forma não haja a exposição de animais aos mesmos^{14, 16-18}.

Neste contexto, este estudo se propõe a avaliar a toxicidade do extrato aquoso de *W. douradinha* através da utilização de ensaio *ex vivo* em globo ocular de frangos, pela utilização de parâmetros macroscópicos e análise histopatológica, a fim de determinar uma maior segurança para o uso tópico deste fitoterápico. Mais ainda, objetivamos demonstrar dados que justifiquem a utilização deste ensaio como teste de triagem para soluções com pretensão de comercialização, diminuindo o número de animais nos testes *in vivo*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. *Whalteria douradinha*– coleta e confecção do extrato:

A *W. douradinha* foi coletada manualmente na zona rural do município de Santana da Boa Vista (RS/Brasil, 30°36'54"S, 53°08'11"O), sendo uma exsicata identificada e catalogada pelo Herbário da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) com identificação: PEL nº26318. Amostras da douradinha do campo foram enviadas ao Laboratório de Oleoquímica e Biodiesel do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPel onde foram secas e armazenadas até a realização da confecção do extrato aquoso através da técnica convencional de extração por esgotamento. O produto final (extrato aquoso) foi congelado em *ultra-freezer* (-80 °C) até o uso.

2. *Ensaio experimental*:

2.1. Enucleação e estabilização do globo ocular:

Para a realização do ensaio de toxicidade foi preconizado o protocolo conforme a OECD - *Guideline for the Testing of Chemicals - Isolated Chicken Eye Test* – normativa 438¹⁴. Neste experimento foram utilizados doze (n=12) globos oculares provenientes de frangos previamente abatidos para o comércio (Cooperativa Sul Rio Grandense de Laticínios Ltda.). O material oriundo do abate foi transportado em refrigeração até o local do experimento, onde foram adotadas medidas para sua manutenção. Com o globo ocular íntegro foi realizada enucleação, sendo os olhos imediatamente posicionados de forma a receber solução fisiológica de NaCl 0,9% em gotejamento controlado (3-4 gotas/minuto a 33°C, por 50 minutos).

2.2. *Waltheria douradinha*– Teste em olho de frango ex vivo (Chicken Enucleated Eye Test):

Para realização do ensaio de irritabilidade ocular foram utilizados grupos controles negativo (CN - solução fisiológica de NaCl 0,9% / n=4), controle positivo (CP- ácido acético 10% / n=4) e grupo pesquisa (WD- extrato aquoso de *W. douradinha* 100% / n=4). Todos olhos receberam 10µL de solução de acordo com seu grupo, a solução agiu por contato direto na superfície do globo ocular por 10 segundos, e posteriormente foi lavada com 20mL de solução fisiológica em jato constante. Ainda nesta etapa cada globo ocular recebeu uma gota da solução oftálmica de fluoresceína sódica 1%, também sendo retirada através de jato constante, a fim de caracterizar uma das análises posteriores.

3. Critérios para Análise da Toxicidade:

Cada critério foi submetido à análise por três avaliadores independentes, com auxílio de lupa oftálmica e feixe de luz, para os parâmetros de retenção de fluoresceína sódica, opacidade de córnea e inchaço de córnea. Durante todo processo os olhos foram mantidos em condição constante de gotejamento controlado (solução fisiológica de NaCl 0,9%, 3-4gotas/min à 33°C).

A análise para retenção de fluoresceína foi realizada após a instilação dos produtos (T0) e trinta minutos após (T1). Foram determinados escores numéricos para este parâmetro em: Globo ocular sem retenção de fluoresceína (zero), mínima retenção

(0,5), coloração única espalhada por toda córnea (1), coloração única focal ou confluyente (2), e áreas confluentes da córnea com retenção de fluoresceína (3).

Para o critério referente à opacidade de córnea os tempos de avaliação foram em 30 (T1), 75 (T2), 120 (T3), 180 (T4), e 240 (T5) minutos após a instilação do produto. Foram observados como critério: Globo ocular sem opacidade (zero), opacidade ocular mínima (0,5), áreas dispersas ou difusas com detalhes da íris claramente visíveis (1), fácil percepção da área translúcida com detalhes da íris pouco obscurecidos (2), opacidade de córnea severa com tamanho de pupila minimamente perceptível (3), e opacidade de córnea completa com íris invisível (4).

Os critérios para inchaço de córnea foram realizados por comparação entre os grupos CN (escore negativo) e grupo CP (escore máximo positivo/+++). Neste quesito também foram feitas análises do T1 até o T5.

4. Histopatologia:

Após o ensaio, os globos oculares foram armazenados em formalina 10% e enviadas ao setor de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel, para confecção dos cortes e análise histopatológica, determinando alterações em nível de córnea, estroma e endotélio corneano, sendo novamente divididos em alterações de vacuolização, erosão e necrose.

5. Análise estatística:

Os resultados observados foram tabelados e analisados estatisticamente pelo método de *Kruskal Wallis* em programa *Statistix* 9.0 e expressos neste manuscrito em forma textual e de tabelas, assim como os dados referentes à histopatologia. Para determinar a categoria de irritabilidade oftálmica foi utilizada recomendação da OECD.

RESULTADOS

Conforme descrito anteriormente, as análises macroscópicas foram realizadas por parâmetros pré-determinados pela OECD para os critérios de retenção de fluoresceína, opacidade de córnea e inchaço de córnea. Para o critério de retenção de fluoresceína, tanto no momento T0, quanto T1, os olhos nos quais foi instilado *W. douradinha*, demonstraram ausentes ou minimamente impregnados com este corante

oftálmico, resultados promissores quando comparados ao grupo CP ($P < 0,05$), onde os olhos demonstraram pigmentação relevante (Tabela 1).

Os resultados para os parâmetros macroscópicos de opacidade e inchaço de córnea foram expressos na Tabela 2. No parâmetro referente à opacidade de córnea, observaram-se menores índices de alterações macroscópicas por parte do grupo WD, porém não houve diferença estatística entre nenhum dos grupos analisados nos tempos T1, T2 e T3. Nos momentos T4 e T5, WD obteve um melhor resultado que o grupo CP ($P < 0,05$). Já para o critério referente ao inchaço de córnea, os olhos do grupo WD, além de demonstrarem menores índices de alteração macroscópica em todos os momentos avaliados, obtiveram diferença estatística quando comparados ao grupo CP nos momentos T3, T4 e T5 (Tabela 2).

Perante a análise histopatológica, em nosso grupo controle positivo (CP), foram observadas alterações de grau máximo em 100% dos globos oculares, enquanto que no negativo (CN), não foram observadas alterações em nenhum dos olhos. Já para o grupo WD, no primeiro quesito, vacuolização, dos seis olhos um apresentou alterações pouco significativas, quatro apresentaram alterações mínimas e um demonstrou alterações discretas. Para o critério de erosão, três olhos apresentaram resultado negativo (ausência completa de alterações), um com alterações pouco significativas, um com alterações mínimas e um com alterações discretas. Quanto à necrose, somente dois olhos apresentaram alterações, e essas pouco significativas (Tabela 3).

Os resultados referentes às alterações observadas nos olhos que receberam contato com extrato aquoso de *W. douradinha* foram agrupados em médias por momento de avaliação e classificados conforme o grau de irritabilidade de acordo com a determinação de irritabilidade descrita pela OECD (Tabela 4). Sendo que em nenhum dos momentos os olhos do grupo WD obtiveram classificação maior que I (referente à ação não irritante), sendo o maior escore apresentado nos momentos T3 e T5 com valor de 0,25 para opacidade de córnea.

DISCUSSÃO

Este estudo aplica, de forma inédita, um ensaio substitutivo *ex vivo* na avaliação da irritabilidade induzida por um extrato vegetal, indicando este como método de

triagem e alternativa ao teste de *Draize*. O teste de *Draize* foi desenvolvido inicialmente na década de 1980 para demonstrar possíveis efeitos adversos causados por produtos em contato com o globo ocular, utilizando como modelo experimental coelhos¹⁵. Em busca de alternativas a esse teste, diversos estudos foram, e estão sendo conduzidos através da utilização de cultivos celulares, teciduais e material oriundo de animais enviados ao abate comercial^{14, 21}. Diversas espécies já foram testadas como modelo, sendo o globo ocular dos frangos o que reproduz resultados mais fidedignos aos demonstrados no teste de *Draize*, quando consideradas soluções aquosas¹⁷. O teste de toxicidade utilizando globo ocular de frangos já é realizado, principalmente para soluções com elevado grau de irritabilidade, fazendo com que diminuam as situações de uso desnecessário de animais experimentais^{16, 18}. Essa indicação deve ser ampliada, para além dos produtos domésticos, para medicamentos, fitoterápicos e cosméticos.

Neste estudo demonstramos o baixo potencial irritante do extrato aquoso de *W. douradinha* quando em contato com a superfície do globo ocular de frangos, modelo *ex vivo* para irritabilidade tópica de produtos químicos. Esse método alternativo ao ensaio *in vivo* em coelhos, teste de *Draize*, é fiel na determinação do potencial irritante de substâncias¹⁴, tornando-se uma opção para a diminuição do uso de animais em pesquisa. Esta técnica vem sendo implementada, principalmente, para triar a toxicidade de produtos de limpeza e desinfecção¹⁸, sendo este o primeiro relato de seu uso para fitoterápicos. A baixa irritabilidade gerada pelo extrato de *W. douradinha* descrito neste estudo, conforme a Tabela 4, permite traçar uma perspectiva de continuidade às pesquisas por alternativas de prevenção e tratamento de doenças utilizando essa planta.

A análise histopatológica dos olhos contemplou critérios de lesão em nível de córnea, principalmente devido ao baixo tempo de contato da solução com o globo ocular, o qual também foi o sítio de contato direto^{14, 20}. As particularidades dos olhos dos frangos, quando comparados a outras espécies, fazem com que este seja eleito como o padrão substitutivo aos testes de *Draize* para soluções aquosas. As lesões descritas decorrem da camada ocular externa, visto que em situação de contato real o olho possui diversos mecanismos para redução da irritabilidade^{19, 20}. Os critérios para possíveis alterações na córnea foram baseados em análises padronizadas anteriormente¹⁸, onde eram consideradas as camadas do epitélio, estroma e endotélio procurando observar-se a presença ou ausência de alterações e as lesões classificadas em vacuolização, erosão e

necrose. Estas alterações também foram classificadas em escores conforme o descrito na Tabela 3. As alterações histopatológicas encontradas neste estudo podem ser classificadas como discretas em relação ao grupo controle, e são consideradas como não irritantes^{18,21}.

O presente estudo demonstra não só a baixa irritabilidade tópica de um fitoterápico do bioma Pampa, mas também uma alternativa ao uso de animais experimentais, no que diz respeito à toxicologia, uma vez que é passível de ser aplicada com extratos vegetais e deve ser indicado, sempre que possível, antes de testes em modelos animais. Essa iniciativa vem ao encontro de orientações da Comissão de Coordenação Interinstitucional de Validação de Métodos Alternativos (ICCVAM) e do Centro Inter-agencial do Programa Nacional de Toxicologia de Avaliação dos Métodos Alternativos toxicológicos (NICEATM), que buscam ensaios fidedignos como alternativa ao uso de animais¹⁷. Recentemente no Brasil o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, criou a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) ao uso de animais, visando fomentar esse campo da pesquisa através dos princípios dos 3Rs (*Reduction; Refinement; Replacement*)²².

A OECD¹⁴ pré-determinou critérios para a avaliação macroscópica da toxicidade ocular em frangos. Utilizando estes mesmos critérios, demonstramos os baixos índices de irritabilidade ocular do extrato aquoso de douradinha do campo, para retenção de fluoresceína, opacidade de córnea e inchaço de córnea (com modificações). Foram observados resultados com maior proximidade entre o extrato aquoso de douradinha do campo (WD) e o controle negativo utilizando solução fisiológica de NaCl 0,9% (CN), quando comparados estes e o controle positivo (CP), que foram expostos a ácido acético 10% (CP). Como neste estudo utilizamos o extrato de *W. douradinha* puro, sem diluição, este ainda gerou algumas alterações, particularmente na estrutura histopatológica dos olhos. Entretanto, como o uso popular deste extrato se dá de forma diluída, como chá ou emplastro, a remota chance de efeitos adversos se torna quase nula.

CONCLUSÃO

Os dados gerados nesse estudo associados ao potencial terapêutico atribuído à *W. douradinha*⁷⁻¹⁰ justificam mais ensaios acerca desta planta, tanto para comprovar seu potencial medicinal, quanto para descrever de forma mais criteriosa suas características toxicológicas. Desta forma, concluímos que o extrato aquoso de *W. douradinha* possui um baixo grau de toxicidade perante as análises macroscópicas e histopatológicas realizadas em modelo *ex vivo*, utilizando globo ocular de frangos. Concluímos ainda que este é um ensaio passível de ser utilizado neste tipo de composto, sendo indicado seu uso, sempre que possível, antes de se proceder para experimentação em animais.

AGRADECIMENTOS:

Ao CNPq (processo 305072/2012-9) e CAPES pela bolsa de pós-graduação e auxílio no desenvolvimento à pesquisa. À empresa Danby Cosulati, e médico veterinário Maurício Braga Puccinelli (Gerente Frigorífico), Cooperativa Sul Rio Grandense de Laticínios Ltda. Unidade de Avicultura Morro Redondo/RS. Ao setor de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Veterinária da UFPel. Ao Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química e Geociência, UFPel.

BIBLIOGRAFIA:

1. Wang J, Ruan Y, Cai Q, Haixing X, Yun-xia W. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescen*. J Ethnopharmacology.2011. Apr 12; 134(3):1033-8. doi: 10.1016/j.jep.2011.02.010.
2. Silveira PF, Bandeira MAM, Arraias PSD. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. Rev Bras Farmacogn. 2008;18(4):618-26.doi:10.1590/S0102-695X2008000400021
3. Cordeiro CHG, Sacramento LVS, Corrêa MA, Pizzolitto AC, Lara EHG, Moraes HP. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. Rev Bras Pl Med. 2006; 8(4):173-82.

4. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciências, Tecnologia e Insumos Estratégicos. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos. Brasília, DF, 2006. [Citado 28 maio 2014] Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf
5. Groth D. Identificação botânica de plantas e sementes de espécies invasoras na cultura da soja. *Rev Bras Sementes*. 1980; 2(3):59-95.
6. Logarzo G, Gandolfo D, Cordo H. Biology of *Apagomerella versicolor* (Boheman) (Coleoptera: Cerambycidae) in Argentina, a candidate for biological control of cocklebur (*Xanthium spp.*). *Biol Cont*. 2002 Set; 25(1):22-9. doi: 10.1016/S1049-9644(02)00043-9
7. Hoelzel SC, Vieira ER, Giacomelli SR, Dalcol II, Zanatta N, Morel AF. An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheria douradinha*. *JPhytochem*. 2005 May; 66(10):1163-7. doi: 10.1016/j.phytochem.2005.03.019
8. Gressler V, Stüker CZ, Dias O, Dalcol II, Burrow RA, Schmidt J, Wessjohann L, Morel AF. Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*. *J Phytochem*. 2008 Feb; 69(4):994-9. doi: 10.1016/j.phytochem.2007.10.018
9. Schmidt C, Fronza M, Goettert M, Geller F, Luik S, Flores EMM, et al. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. *J Ethnopharmacol*. 2009 Apr; 122(3):523-32. doi: 10.1016/j.jep.2009.01.022.
10. Zongo F, Ribuo C, Boumendjel A, Guissou I. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (syn. *Waltheria americana*): a review. *J Ethnopharmacol*. 2013 Jun 21; 148(1):14-26. doi: 10.1016/j.jep.2013.03.080.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. Legislação. Resoluções. Resolução –

RDC n°. 17 de 24 de fevereiro de 2000. [Citado 28 maio 2014] Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1380>

12. Raymundo MM, Goldim JR. *Ética da pesquisa em modelos animais. Revista de Bioética. 2002; 10(10):31-44.*
13. Idrus RBH, Chowdhury SR, Manan NABA, Fong OS, Adenan MI, SaimAB. Aqueous extract of *Centella asiatica* promotes corneal epithelium wound healing *in vitro*. *J Ethnopharmacol.* 2012 Mar; 140(2):333-8. doi: 10.1016/j.jep.2012.01.023.
14. OECD, Guideline for the Testing of Chemicals *Test No. 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants.* 2012 Dec; p1-19. [Citado 28 maio 2014] Disponível em: http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-438-isolated-chicken-eye-test-method-for-identifying-ocular-corrosives-and-severe-irritants_9789264076310-en
15. Burton ABG, York M, Lawrence RS. *The in vitro assessment of severe eye irritations. Cosmect Toxicological.* 1981; 19:471-80.
16. Prinsen MK. *The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potencial of test materials. Food Chem Toxicol.* 1996 Mar; 34(3):291-6. doi: 10.1016/0278-6915(95)00115-8
17. Prinsen MK. *The Draize eye test and in vitro alternatives; a left-handed mirraage?. Toxicol In Vitro.* 2006 Feb; 20(1):78-81. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.030
18. Schutte K, Prinsen MK, McNamee, Roggerband R. The isolated chicken eye test as a suitable *in vitro* method for determing the eye irritation potencial of household cleaning products. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2009 Aug; 54(3):272-81. doi: 10.1016/j.yrtph.2009.05.008.

19. Prinsen MK, Schipper MEI, Wijnands MVW. *Histopatology in the isolated chicken eye test and comparison of different staining of the córnea. Toxicol In Vitro.* 2011 Oct; 25(7):1475-9. doi: 10.1016/j.tiv.2011.04.028.
20. Prinsen MK, Koëter HBWM. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food Chem Toxicol.* 1993 Jan; 31(1):69-76.
21. Price JB, Andrews IJ. *The in vitro assessment of eye irritancy using isolated eye. Food Chem Toxicol.* 1985 Feb; 23(2):313-315.
22. *Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Portaria n° 491 de 3 de Julho de 2012.* DOU de 05/07/2012 n° 129, Seção 1, pág. 19. [Citado 28 maio 2014]
Disponívelem:
http://www.lex.com.br/legis_23490615_PORTARIA_N_491_DE_3_DE_JULHO_DE_2012.aspx

Tabela 1. Resultados demonstrados pela instilação de extrato aquoso *W. douradinha* (WD1 e WD2), solução fisiológica de NaCl 0,9% (CN) e ácido acético 10% (CP), nos tempos zero (T0) e trinta minutos (T1) em olho de frango para o critério de retenção de fluoresceína sódica. Dados apresentados em escore mediano (escore mínimo – máximo)

Tratamento		Retenção
NaCl 0,9% (CN)		0,5 (0 – 0,5) A
Ác. Acético 10%(CP)	T0	1 (1 – 1) B
Douradinha (WD1)		0 (0 – 0,5) A
Douradinha (WD2)		0 (0 – 1) A
NaCl 0,9%		0,5 (0 – 0,5) A
Ac. Acético 10%	T1	1 (1 – 1) B
Douradinha (WD1)		0 (0 – 0,5) A
Douradinha (WD2)		0 (0 – 0,5) A

A e B – representam diferença estatística ($p < 0,05$) durante o mesmo período de tratamento para o critério analisado conforme a coluna.

Tabela 2. Critérios de opacidade e inchaço de córnea nos tempos 30 (T1), 75 (T2), 120 (T3), 180 (T4) e 240 (T5) minutos, após a instilação de solução fisiológica de NaCl 0,9% (CN), ácido acético 10% (CP) e extrato aquoso de *W. douradinha* (WD) em olho de frango. Dados apresentados em escore mediano (escore mínimo – máximo)

Tratamento	Tempo	Opacidade	Inchaço
NaCl 0,9%		0 (0 – 0,5)	-
Ac. Acético 10%	T1	1,25 (0,5 – 2)	+++
Douradinha (WD1)		0 (0 – 1)	- (-/+++)
Douradinha (WD2)		0 (0 – 0,5)	+ (-/+++)
NaCl 0,9%		0 (0 – 0,5)	- A
Ac. Acético 10%	T2	1,25 (0,5 – 2)	+++ B
Douradinha (WD1)		0 (0 – 1)	+ (-/+++) B
Douradinha (WD2)		0 (0 – 0,5)	+ (-/+++) AB
NaCl 0,9%		0,5 (0 – 0,5)	- A
Ac. Acético 10%	T3	1,25 (0,5 – 2)	+++ B
Douradinha (WD1)		0,5 (0 – 1)	- (-/+++) A
Douradinha (WD2)		0 (0 – 1)	+ (-/+++) A
NaCl 0,9%		0,5 (0 – 0,5) AB	- A
Ac. Acético 10%	T4	1,5 (0,5 – 2) B	+++ B
Douradinha (WD1)		0 (0 – 0,5) A	- (-/+++) A
Douradinha (WD2)		0 (0 – 1) AB	+ (-/+++) A
NaCl 0,9%		0,5 (0 – 0,5) AB	- A
Ac. Acético 10%	T5	1,5 (0,5 – 2) B	+++ B
Douradinha (WD1)		0 (0 – 0,5) A	- (-/+++) A
Douradinha (WD2)		0,5 (0 – 1) AB	- (-/+++) A

A e B – representam diferença estatística ($p < 0,05$) durante o mesmo período de tratamento para o critério analisado conforme a coluna.

Tabela 3. Resultados referentes à análise histopatológica dos olhos de frango instilados com extrato aquoso de *W. douradinha* (WD), solução fisiológica de NaCl 0,9% (CN) e ácido acético 10% (CP), para os critérios de lesão em córnea.

Produto	Córnea			Outras alterações
	Vacuolização	Erosão	Necrose	
WD1	++	+	Negativo	Negativo
WD2	++	++	+	Negativo
WD3	+++	+++	+	Negativo
WD4	+	Negativo	Negativo	Negativo
WD5	++	Negativo	Negativo	Negativo
WD6	++	Negativo	Negativo	Negativo
CN1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CN2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CN3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
CP1	++++	++++	++++	++++
CP2	++++	++++	++++	++++
CP3	++++	++++	++++	++++

(++++) Grau máximo de alterações da córnea para vacuolização, erosão e necrose do epitélio (alterações no estroma e endotélio corneano moderadas);

(+++) Alterações discretas de vacuolização do epitélio da córnea e do estroma

(Ausência de alterações do endotélio);

(++) Alterações mínimas de vacuolização do epitélio (ausência de alterações no estroma ou endotélio);

(+) Alteração pouco significativa do epitélio;

Negativo: Sem alterações.

Tabela 4. Determinação da categoria de irritabilidade oftálmica em frangos conforme tabela de escores para os critérios de opacidade de córnea e retenção de fluoresceína.

Opacidade de Córnea	Retenção de Fluoresceína	Categoria de irritabilidade ocular
0 – 0,5	0 – 0,5	I – Não irritante
0,6 – 1,5	0,6 – 1,5	II – Irritante Leve
1,6 – 2,5	1,6 – 2,5	III – Moderadamente Irritante
2,6 – 4,0	2,6 – 3,0	IV - Severamente Irritante

3.3 Artigo 3

***Waltheria douradinha*: Estudo citotóxico e caracterização química**

Eduardo Garcia Fontoura; Samuel Rodrigues Félix; Eduarda Santos Bierhals;
Gefferson Fischer; Ivandra Ignes de Santi; Fábio Chaves; Márcia de Oliveira Nobre

Será submetido a Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

***Waltheria douradinha*: Estudo Citotóxico e Caracterização química**

FONTOURA, E.G.^{1*}; FÉLIX, S.R.¹; BIERHALS, E.S.¹; FISCHER, G.¹; SANTI, I.

I.¹; CHAVES, F.¹; NOBRE, M.O.¹

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão s/n, Capão do Leão, RS, 96015-560, Brasil. *eduardogfontoura@gmail.com.

RESUMO: A *Waltheria douradinha* é uma planta pertencente ao bioma pampa, pouco estudada e utilizada extensamente de forma empírica. Assim, o objeto de nosso estudo foi avaliar os componentes do extrato aquoso de *W. douradinha* através de cromatografia líquida de ultraperformance, além de testar seu efeito citotóxico *in vitro* quando exposta a células da linhagem MDBK e VERO. Para o ensaio citotóxico foram utilizadas concentrações a partir de 10% do extrato aquoso de *W. douradinha*, seguindo uma sequência de diluições até 0,0001%. A leitura das placas procedeu com o auxílio de corante de vermelho neutro em espectrofotômetro com comprimento de onda de 492nm, 48 horas após a exposição ao extrato aquoso. Foram pesquisados os compostos: Santina, Ernenina, Nepetina, Leceosina, Kercetina, Campferol, Miricetina, Aglicona, Apigenina, Morina, Rutina, Galangina, Luteolina, Crisina, Flavonol. Como resultados observamos que quando comparados ao controle, as células expostas as concentrações a partir de 0,1% até 1% do extrato aquoso não demonstraram citotoxicidade, sendo caracterizadas como tóxicas as concentrações de 10, 5 e 1%, quando em contato direto com as células. Ainda, foram identificados compostos flavonoides de ação anti-inflamatória: Luteolina, Kercetina, Kaempferol e Rutina. Assim, concluímos que o extrato aquoso de *W. douradinha* possui atividade citotóxica nas concentrações maiores que 1%, sendo possível

identificar compostos com ação anti-inflamatória, como a Rutina, Kercetina, Kaempferol e Luteolina.

Palavras-chave: células, cróton, douradinha-do-campo, otite

ABSTRACT: *Waltheria Douradinha*: Cytotoxic Study and Chromatography Observation.

Waltheria douradinha is a plant belonging to the pampa biome, little studied and widely used empirically. Thus, the objective of our study was to evaluate the components of the aqueous extract of *W. douradinha* through liquid chromatography of ultraperformance, as well as to test the in vitro cytotoxic effect caused by the exposure of cells to the aqueous extract of *W. douradinha*. Concentrations were used for the cytotoxic assay from 10% of the aqueous extract of *W. douradinha*, following a dilution sequence up to 0.0001%. The plates were read with neutral red dye in a spectrophotometer with a wavelength of 492 nm, 48 hours after exposure to the aqueous extract. The compounds were studied: Santina, Ernenina, Nepetina, Leceosin, Kercetina, Campferol, Miricetina, Aglicona, Apigenina, Morina, Rutina, Galangina, Luteolin, Crisina, Flavonol. As results we observed that when compared to the control, the exposed cells concentrations from 0.1% to 1% of the aqueous extract showed cytotoxicity, being characterized as toxic the concentrations of 10, 5 and 1%, when in direct contact with the cells. Flavonoid compounds of anti-inflammatory action were identified: Luteolin, Kercetina, Kaempferol and Rutina. Thus, we conclude that the aqueous extract of *W. douradinha* has cytotoxic activity at concentrations higher than 1%, and it is possible to identify compounds with anti-inflammatory action, such as Rutin, Kercetina, Kaempferol and Luteolin.

Keywords: cells, cróton, douradinha-do-campo, otitis

INTRODUÇÃO

Há anos os homens utilizam as plantas para tratamento de doenças. O primeiro relato data de 5000 anos atrás, onde são descritos preparos com mais de 250 plantas em diversas receitas (Petraskova et al., 2012). A pesquisa por medicamentos farmacologicamente ativos com eficácia elevada está em pleno desenvolvimento e a busca de drogas alternativas capazes de perturbar o processo inflamatório tornou-se uma questão importante na pesquisa científica, especialmente com referência ao uso de substâncias naturais e a redução de efeitos colaterais indesejáveis (Sá et al., 2014; Yap et al. 2014).

A *Waltheria douradinha* (popularmente conhecida como douradinha-do-campo) é uma planta subarborescente, ereta e que se desenvolve em solos arenosos. Faz parte da família Malvaceae, a qual possui diversos compostos bioativos com ação já descrita (Lorenzi & Matos, 2002; Lorenzi, 2008; Schmidt et al., 2009). As indicações populares de utilização vão desde o tratamento de processos inflamatórios, tratamento cicatrizante de feridas cutâneas, agente expectorante, antimicrobiana, tratamento de distúrbios de pressão arterial, ou ainda neoplasmas, entre outros (Lorenzi & Matos, 2002; Schmidt et al., 2009). Baseados nessas premissas, o objetivo de nosso estudo foi realizar uma abrangente caracterização do extrato aquoso de *W. douradinha* por LC-MS/MS, assim como avaliar o efeito citotóxico *in vitro* causado pela exposição de células da linhagem MDBK (*Madin Darby Bovine Kidney*) e VERO (*kidney epithelial cells from african monkey*) ao extrato aquoso de *W. douradinha*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de material botânico, identificação e preparo do extrato aquoso

As amostras de *W. douradinha* foram colhidas conforme abundância na zona rural do município de Santana da Boa Vista, RS - Brasil (30°36'54"S, 53°08'11"O). A coleta foi feita em terreno de encostas, pedregoso, a cerca de 50m da mata ciliar. As amostras foram encaminhadas ao Herbário da Universidade Federal de Pelotas para identificação e catálogo, onde a exsicata foi identificada como *Waltheria douradinha* Saint Hilarie, nº: 26.318.

Todo o material colhido foi encaminhado ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UFPel. O material foi limpo e lavado em água corrente para retirada de solo remanescente. Posteriormente as amostras foram secas em estufa de circulação de ar e pulverizadas em moinho de facas rotativo. O extrato foi confeccionado através da técnica de Ultrassom por esgotamento. Foram utilizados 25g da planta (pulverizada) com 250mL de solvente (água) a 30°C por um período de 30 minutos. Ao término foram filtrados e adicionados mais 250mL de solvente na mesma planta para uma nova extração, ao final das duas extrações os filtrados foram unidos em uma única solução, resultando em um extrato com concentração relativa de 0,05 g.mL⁻¹, com o extrato sendo posteriormente seco em liofilizador.

Análise do extrato por LC-Q TOF MS

As análises por LC-QTOF MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Bidentate C18 (100 x 2.1 mm, MicroSolv Technology Corporation, Eatontown, NJ, EUA) empregando como fase A água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e como fase B acetonitrila com 0,1% de ácido

fórmico (v/v) e o seguinte programa de gradiente: 5% B (0,0 min), 0-90% B em 0.01-15 min, 90% em 15-18 min e 90-5% B em 18,01-20 min. Depois de cada injeção a coluna foi re-equilibrada por 6 minutos utilizando a composição do solvente inicial. Foi injetado 10 µL de extrato em fluxo constante de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna mantida a 40°C para todas as análises. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo e negativo utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, -4000 V e +4000V; pressão do gás de nebulização (N₂), 2 bar; fluxo do gás de secagem, 8 L min⁻¹, temperatura da fonte, 180°C; colisão de RF, 150 Vpp; transfer, 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. Os espectros de massas foram adquiridos em um rango de 50 a 1200 m/z a 4 espectros/s para ambos modos de ionização. As análises MS/MS foram obtidas por fragmentação automática empregando os seguintes valores de energia de colisão: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV e usando N₂ como gás de colisão. A calibração externa foi realizada utilizando Formiato de sódio 10Mm como calibrante, cobrindo toda a faixa de aquisição de 50-1200 m/z.

Processamento dos dados e identificação dos metabólitos

Os dados brutos do LC-MS/MS foram processados usando a ferramenta "Dissect" do Data Analysis (versão 4.2, Bruker Daltoniks). A estimativa da fórmula elementar foi realizada através da ferramenta SmartFormula do Data Analysis com o uso da massa experimental de alta exatidão fornecida pelo MS e do perfil isotópico. A identificação tentativa foi realizada por comparação dos valores de m/z, fórmulas moleculares e padrão de fragmentação obtidos com aqueles reportados em base de dados como: METLIN (<https://metlin.scripps.edu/index.php>), Food Database (<http://foodb.ca/>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Mass bank (<http://www.massbank.jp/QuickSearch.html>).

Determinação do efeito citotóxico

Foram utilizadas células da linhagem MDBK e VERO. Tais células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), suplementado com antibióticos e antifúngicos, acrescido de 10% de soro fetal bovino. Posteriormente, foram mantidas em estufa umidificada a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂. Após formarem uma monocamada confluyente, alíquotas foram coletadas, para que fosse realizado o subcultivo em placas com fundo chato de 96 cavidades. As células subcultivadas foram mantidas em MEM em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 24 horas.

Para a diluição do extrato foram utilizados 900µL de MEM, nesta etapa sem o soro fetal bovino, adicionado de 100µL de extrato aquoso de *W. douradinha* caracterizando assim a diluição 1/10. Já na placa, utilizamos 100µL da diluição feita anteriormente contendo o extrato aquoso nos poços A-H/1. Nos poços da coluna 2 em diante, foram adicionados 90µL de MEM sem soro fetal bovino. Finalizando, ocorreu a diluição do extrato do poço 2 sequencialmente até o poço 11, sendo desprezados 10µL ao final. Os poços da coluna 12 foram utilizados para confecção de controles contendo somente MEM. Ao final a placa foi posta em estufa contendo 5% de CO₂ a 37°C por 48 horas.

Para a leitura dos danos celulares que poderiam ser causados pelo extrato aquoso, foi utilizada a coloração de vermelho neutro. O vermelho neutro foi diluído a concentração de 0,033% em MEM, desta solução foram adicionados a cada poço testado a quantia de 200µL, posterior a retirada do MEM contido nos poços. Com o vermelho neutro já em contato com as células, a placa foi posta novamente em incubação a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂. Posterior a isso, foram retirados dos poços a solução de vermelho neutro e em seguida adicionados a cada poço 100µL de solução solubilizante

(50% etanol, 1% ácido acético e água destilada q.s.p.). Após 10 minutos se procedeu à leitura em espectrofotometro de placas, com o comprimento de onda de 492nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por diversas vezes os fitoterápicos são empregados pela população para o tratamento de enfermidades crônicas, somados à crença de que tais medicamentos trarão menos efeitos adversos quando comparados ao uso dos medicamentos alopáticos, e ainda, seu custo por muitas vezes também se demonstra menor (CACCIA-BAVA et al., 2017). Este fato ressalta o impacto de nosso estudo. Diversos órgãos governamentais, principalmente em países subdesenvolvidos, incentivam o uso de medicamentos oriundos de plantas medicinais (HASENCLEVER et al., 2017). Quando propomos o ensaio citotóxico, elenos possibilita a observação da toxicidade gerada pelo extrato aquoso de *W. douradinha* quando em contato direto com células. A incorporação do corante pelas células foi lida e demonstrada em valores de absorbância por espectrofotômetro de placas, os índices demonstrados pela coluna controle foram adotados como padrão 100%, índices superiores a 90% adotados como não citotóxicos. Foram utilizadas concentrações a partir de 10% (dose máxima) seguindo uma sequência de diluições até 0,0001%. Quando comparados ao controle, as concentrações menores que 1% não demonstraram a toxicidade, sendo caracterizadas como tóxicas para as células, as concentrações de 10, 5 e 1% (figura 1). Já foram relatados que fatores intrínsecos, relacionados as células, influenciam em sua sensibilidade a substâncias tóxicas, incluindo biotransformação química, formas de ligação, características de permeabilidade da membrana, vias de síntese intracelular e mecanismos de adaptação e de recuperação (Ekwall et al., 1990).

Supõe-se que os resultados tóxicos encontrados nas concentrações de 10 e 5% estejam mais relacionados à diluição do meio de cultura do que a toxicidade da *W. douradinha*. Ainda, os mecanismos de toxicidade diferem entre as células e os preparados de extrato, tal fato foi observado quando Nondo et al. (2015) descreveram que o extrato de maior toxicidade perante o ensaio de atividade citotóxica em células LLC-MK2, não demonstrou toxicidade quando desafiou larvas de camarão no teste de “*brine shrimp*”. Tal teste é recomendado para detecção de constituintes químicos farmacologicamente ativos, plantas com uso medicinal em potencial, frente a espécimes de camarão (*Artemia salina* L.) (Olowa& Nuñez, 2013; Nondo et al., 2015). Mas também, as vantagens do uso de células como metodologia para avaliação da toxicidade vão desde a praticidade e facilidade de execução da técnica, o baixo custo relativo, e a rapidez para obtenção de resultados (Martinez et al., 2009).

Sobre a especificidade do corante de vermelho neutro, ele ultrapassa a barreira da membrana celular e se deposita junto aos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos da matriz lisossomal. Substâncias tóxicas irão causar lesão em nível de membrana celular, conseqüentemente diminuição das ligações entre o vermelho neutro e os lisossomos. Assim, quanto menos tóxica a substância, mais coloração irá absorver, sendo possível distinguir as células vivas das mortas ou danificadas pela intensidade de cor, onde células viáveis estavam coradas (Rogerio et al., 2003).

O perfil metabólico do extrato aquoso de *W. douradinha* foi analisado por LC-MS/MS no modo positivo e no modo negativo. Depois da detecção dos picos, filtrado e agrupamento dos picos, um total de 126 metabolitos foram detectados extrato aquoso de *W. douradinha* analisado no modo positivo e modo negativo. Os metabolitos foram tentativamente identificados por comparação dos valores de m/z, fórmulas moleculares e

padrão de fragmentação obtidos com aqueles reportados em base de dados disponíveis on-line como Food Database (<http://foodb.ca/>), METLIN (<https://metlin.scripps.edu/index.php>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Mass bank (<http://www.massbank.jp/QuickSearch.html>). Sempre que possível, a identificação de alguns metabolitos foi corroborada pela comparação com padrões analíticos disponíveis. Várias classes de metabólitos como alcaloides, compostos fenólicos, ácidos orgânicos, entres outros foram identificados no extrato de *W. douradinha*, dentre estes, Waltherina A, Waltherina B, Waltherina C e Waltherione A. Esses compostos já foram descritos como alguns dos alcaloides geralmente isolados de *W. douradinha* (Morel et al., 1999; Morel et al., 1999 (b); Hoelzel et al., 2005). O alcaloide quinolonico Waltherione A tem sido recentemente descrito como um potente agente antiinflamatório que atua através da inibição do fator nuclear-kappa B (NF- κ B), um mediador chave da resposta inflamatória (Monteillier et al., 2017). Os flavonoides são outro importante grupo de metabólitos presentes em plantas, pertencente classe dos compostos fenólicos, e amplamente reconhecidos por sua atividade anti-inflamatória. Ademais da ação anti-inflamatória os flavonoides também são descritos por apresentarem diversas outras atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiano, antiviral e anti-hepatotóxico (Rathee et al., 2009). Peluso et al. (2013) descrevem alimentos ricos em flavonóides como potenciais moduladores da resposta inflamatória através da ativação de citocinas pró-inflamatórias. De acordo com Vezza et al. (2016) os flavonoides são capazes de atuar como moduladores em doenças inflamatórias crônicas e também associam estes compostos a diminuição da lesão histológica em modelos experimentais de inflamação intestinal. Ainda, os flavonoides encontrados em maior abundância em na *W. douradinha* foram: rutina, kercetina e luteolina. Entretanto, outros flavonoides, como Kaempferol-7-O- α -L- rhamnoside, Quercetin-3-O-allopyranoside, Gossyptin 8-glucuronide,

2''-O-Glucosylvitexin, herbacetin-8-O-glucuronide, Myricetin 3'-glucoside também foram detectados no extrato.

Durante a análise cromatográfica identificamos quatro compostos condizentes com a ação anti-inflamatória da *W. douradinha* são: Rutina, Kercetina, Campferol e Luteolina. Dois dos flavonoides por nós encontrados no extrato aquoso da *W. douradinha* (Kercetina e kaempferol) são descritos por sua ação altamente significativa como anti-inflamatórios. Estão relacionados aos dois compostos a inibição das enzimas fosfolipase A2, inibição da lipooxigenase, ciclo-oxigenase e ainda inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) e diminuição no recrutamento de eosinófilos. A Rutina é descrita como composto de ação anti-inflamatória capaz de inibir a enzima cicloxigenase, e apta a inativar a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1. Da mesma forma a Luteolina é reconhecida por ser eficiente na inibição da atividade de leucócitos, na inativação da liberação do óxido nítrico e também por ser capaz de diminuir a expressão da iNOS, além de desestimular a liberação da enzima cicloxigenase (Coutinho et al., 2009; Serafini, Peluso & Raguzzini, 2010; Pérez-Cano & Castel, 2016).

Peluso et al. (2013) descrevem alimentos ricos em flavonóides (englobando os mesmos compostos que foram encontrados por nós) como potenciais moduladores da resposta inflamatória através da ativação de citocinas pró-inflamatórias. Estes mesmos autores ainda citam durante sua revisão sistemática de literatura, que é capaz de se recomendar o uso destes alimentos como prevenção a doenças. Ainda, Vezza et al. (2016) citam estes flavonoides como compostos de ação anti-inflamatórias capazes de atuar como moduladores em doenças inflamatórias crônicas, também associando estes compostos a diminuição da lesão histológica em modelos experimentais de inflamação intestinal.

De acordo com Coutinho et al. (2009) a atividade anti-inflamatória da kercetina está relacionada a inibição das enzimas fosfolipase A2, inibição da lipooxigenase, ciclooxigenase e ainda inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS) e diminuição no recrutamento de eosinófilos. Enquanto que a rutina apresenta a capacidade de inibir a enzima ciclooxigenase e é considerada apta a inativar a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (Serafini, Peluso & Raguzzini, 2010; Pérez-Cano & Castel, 2016). Por outro lado, a Luteolina é reconhecida por ser eficiente na inibição da atividade de leucócitos, na inativação da liberação do óxido nítrico e também por ser capaz de diminuir a expressão da iNOS, além de desestimular a liberação da enzima ciclooxigenase (Coutinho et al., 2009; Serafini, Peluso & Raguzzini, 2010; Pérez-Cano & Castel, 2016).

Ademais dos flavonoides os ácidos fenólicos são outra classe de compostos fenólicos sintetizados pela via do Chiquimato, a partir da fenilalanina e da L-tirosina, amplamente conhecidos por suas atividades biológicas (Saxena et al., 2012). Ácido gálico e ácido cafeico são dois dos ácidos fenólicos detectados no extrato de *W. douradinha* reportados na literatura como importantes agentes anti-inflamatórios (Kroes et al., 1992; Da Cunha et al., 2004).

CONCLUSÃO

Nas condições aqui descritas, podemos citar que o extrato aquoso de *W. douradinha* possui atividade citotóxica nas concentrações maiores que 1%, sendo possível também identificar no extrato os compostos Rutina, Kercetina, Kaempferol e Luteolina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem todos colaboradores que de alguma forma auxiliaram na condução deste experimento. Também agradecemos o auxílio financeiro através de bolsa de pós-graduação cedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

COMISSÃO DE ÉTICA E EXPERIMENTAÇÃO NO USO DE ANIMAIS

Protocolo de CEUA, Universidade Federal de Pelotas, nº 8444-2015.

DECLARAÇÃO DE CONFLITOS DE INTERESSE

Nós declaramos não haver qualquer conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

CACCIA-BAVA, M.C.G.G.; et al. Availability of herbal medicines and medicinal plants in the primary health facilities of the state of São Paulo, Southeast Brazil: results from the National Program for Access and Quality Improvement in Primary Care. **Ciência e Saúde coletiva**, v.22, n.5, p.1651-1659, 2017.

COUTINHO, M.A.S.; et al. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p.241-256, 2009.

DA CUNHA, F. M; et al. Caffeic acid derivatives: in vitro and in vivo anti-inflammatory properties. **Free radical research**, v.38, n.11, p.1241-1253, 2004

EKWALLB, S.V.; et al. Toxicity tests with mammalian cell cultures. In: Bourdeau P, Somers E, Richardson GM and Hickman JR (eds) ShortTerm Toxicity Tests for Non-Genotoxic Effects. John Wiley & Sons, Inc., New York, pp 75-97.

HOELZEL, S. C.; et al. An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheria douradinha*. **Phytochemistry**, v. 66, n.10, p.1163-1167, 2005.

HASENCLEVER, L.; et al. The Brazilian phytotherapics industry: challenges and opportunities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, n.8, p.2559-2569, 2017.

KROES, B. V.; et al. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta medica**, v.58, n.06, p.499-504, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas**. Nova Odessa-SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, p.469-470, 2002.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa-SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2008.

MARTINEZ, D.M.et al.Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **ConScientiae Saúde**, v.8, n.1, p.99-104, 2009.

MOREL, A. F.; et al. A new cyclopeptide alkaloid from the bark of *Waltheria douradinha*. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 52, p. 9205-9209, 1999.

MOREL, A. F., et al. Cyclopeptide alkaloids from the bark of *Waltheria douradinha*. **Phytochemistry**, v.51, n.3), p.473-477, 1999b.

MONTEILLIER, A.; et al. Cancer chemopreventive activity of compounds isolated from *Waltheria indica*. **Journal of ethnopharmacology**, v.203, p.214-225, 2017.

NONDO R. S. O.; et al. Evaluation of the cytotoxic activity of extracts from medicinal plants used for the treatment of malaria in kagera and lindi regions, tanzania. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.5,n.4, p.7-12, 2015.

OLOWA L.F.; NUÑEZA O.M. Brine Shrimp Lethality Assay of the Ethanolic Extracts of Three Selected Species of Medicinal Plants from Iligan City, Philippines. **International Research Journal of Biological Sciences**, v.2, n.11, p.74-77, 2013.

SAXENA, M.; et al. Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**,v.16, n.2,p. 130-134, 2012.

PELUSO, I. et al. Flavonoids and imune function in human: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**,v.55, n.3, p.383-395. 2013.

PÉREZ-CANO, F.J.; CASTELL, M. Flavonoids, inflammatoin and imune system. **Nutrients**,v.8, p.659; 2016.

PETROVSKA B.B. Historical review of medicinal plants' usage.**Pharmacognosy Reviews**, v.6, n.11, p.1-5, 2012.

RATHEE, P., et al. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v.8, n. 3, p.229-235, 2009.

ROGERO, S.O.; et al. Teste *in vitro* deCitotoxicidade: Estudo Comparativo Entre Duas Metodologias.**Materials Research**, v.8, n.3, p.317-320, 2003.

SÁ, R.C.S.; et al. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Molecules**,v.19, p.1459-1480; 2014.

SCMIDT, C.; et al. Biological Studies on Brazilian Plants Used in Wound Healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.523-532, 2009.

SERAFINI, M.; et al. Session 1: Antioxidants and the imune system Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**,v.69, p.273-278, 2010.

VEZZA, T. et al. Flavonoids in inflammatory bowel diseases: A review. **Nutrients**, v.8,n.211, p.1-22, 2016.

YAP, P.S.X. et al. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance.**The Open Microbiology Journal**,v.8, p.6-14, 2014.

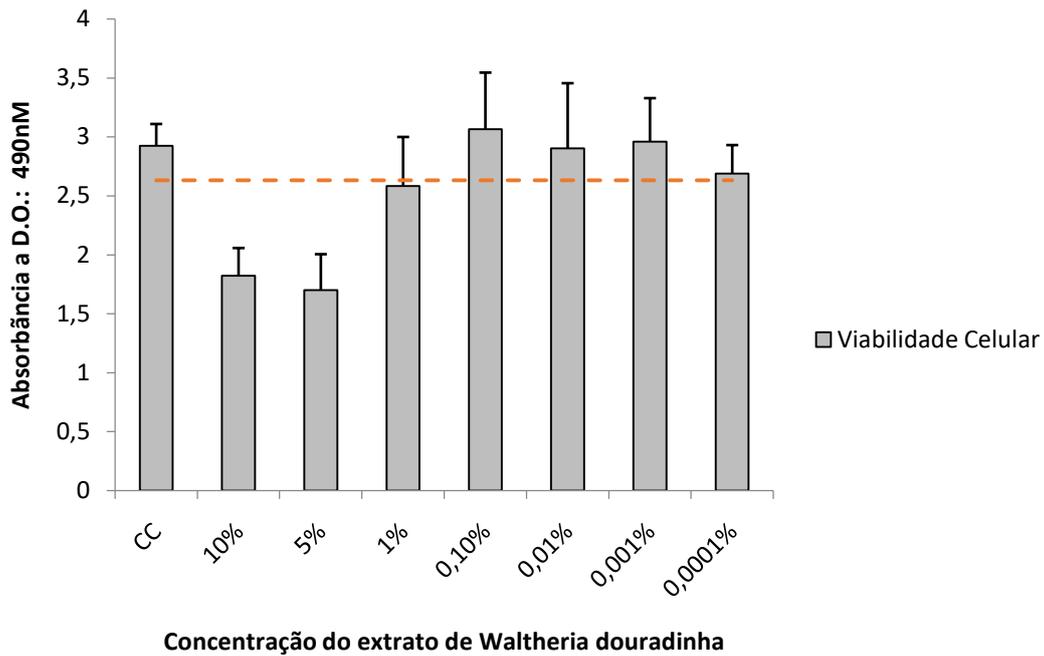


Figura 1: Leitura de viabilidade células através da incorporação de corante vermelho neutro por células MDBK expostas a diferentes concentrações do extrato aquoso de *Waltheria douradinha*. As barras representam as médias dos valores de absorbância para cada concentração de extrato usada. Os bigodes representam o desvio padrão. A linha pontilhada representa o ponto de corte para considerar não citotóxico (90% do controle). CC representa o controle celular, as demais barras são representadas pela diluição do extrato vegetal e porcentagem. Resultados agregados dos ensaios com células VERO e MDBK.

3.4 Artigo 4

Uso do extrato aquoso de *Waltheria douradinha* para o tratamento da otite externa experimental

Eduardo Garcia Fontoura; Samuel Rodrigues Félix; Anelize de Oliveira Campello Felix; Cristina Gevehr Fernandes; Rogério Antonio Freitag; Fábio Chaves; Márcia de Oliveira Nobre

Será submetido à revista Acta Veterinária Brasília

Uso do extrato aquoso de *Waltheria douradinha* para o tratamento da otite externa experimental

Eduardo Garcia Fontoura^{1*}, Samuel Rodrigues Félix², Anelize de Oliveira Campello Felix³, Cristina Gevehr Fernandes⁴, Rogério Antonio Freitag⁵, Fábio Chaves⁶, Márcia de Oliveira Nobre⁷

¹Doutorando - Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel). *Autor para correspondência: eduardogfontoura@gmail.com.

²Pós-doutorando - Programa de Pós-Graduação em Veterinária (PPGV), Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

³Dr^a Médica Veterinária – Biotério Central, Federal de Pelotas (UFPel).

⁴Professora Titular - Departamento de Patologia Animal, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

⁵Professor Adjunto – Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

⁶Professor Adjunto - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

⁷Professora Adjunta - Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

RESUMO

A otite externa é a inflamação do conduto auditivo externo, uma doença de elevada prevalência na medicina veterinária de pequenos animais. O erro no diagnóstico e tratamento induz a uma forma não incomum de cronicidade desta doença, o que acarreta dificuldade de tratamento e danos ao animal. A *Waltheria douradinha* é uma planta pertencente à família Malvaceae, com diversas formas de utilização empírica. Através da indução da inflamação no conduto auditivo de roedores objetivamos avaliar o efeito do tratamento da otite externa experimentalmente induzida com extrato aquoso de *W. douradinha*. Foram utilizados 48 ratos, induzidos a inflamação pela administração de óleo de cróton no conduto auditivo externo. Posteriormente os animais foram alocados aleatoriamente em quatro grupos com tratamentos distintos em: extrato aquoso de *W. douradinha* 100%, extrato aquoso de *W. douradinha* 50%, extrato aquoso de *W. douradinha* 25%, e solução fisiológica de NaCl 0,9%. Aos dois, quatro e seis dias, quatro animais de cada grupo foram avaliados para critérios de

efusão, edema e coloração do conduto auditivo; também foi avaliada a espessura da borda caudal da pinna auricular e peso, por punch de 8mm em balança de precisão, e ainda análise histopatológica. Com base nas metodologias empregadas nós avaliamos o potencial efeito tópicodo tratamento através do uso do extrato aquoso de *W. douradinha*. Dentre os resultados observados em nosso estudo, destacamos a edemaciação nos condutos auditivos tratados com *W. douradinha*, onde critérios de espessura por paquímetro digital e peso por amostra de *punch* foram mais relevantes. Estes resultados, associados a ausência de células inflamatórias durante a análise histopatológica e ausência de efusão macroscópica nos indica que a *W. douradinha* pode constituir formulações posteriores com uma provável ação anti-inflamatória. Por fim, os resultados deste experimento fornecem evidências de que o extrato aquoso de *W. douradinha* pode ser topicamente ativo para o tratamento da otite externa infecciosa experimentalmente induzida. A observação de tumor nas orelhas tratadas, assim como a inexistência de células inflamatórias durante as análises histopatológicas nos denotam o potencial em debelar o agente causador da inflamação. Vale ressaltar que dentre todos os critérios observados o grupo dos condutos auditivos tratados com WD50 demonstrou melhores resultados frente aos demais.

PALAVRAS CHAVE: Fitoterápicos, inflamação, flavonóides, otite, cães.

ABSTRACT

External otitis is characterized by inflammation of the external auditory canal, being a disease of high prevalence in the veterinary medicine of small animals. The error in the diagnosis and treatment induce a non-unusual form of chronicity of this disease, which causes in difficulty of treatment and damages to the animal. *Waltheria douradinha* is a plant belonging to the family Malvaceae, where there are several forms of empirical use. Through the induction of inflammation in the rodent auditory canal we aimed to evaluate the effect of the experimentally induced external otitis treatment in rodents with aqueous extract of *W. douradinha*. Forty-eight rats were induced, inducing inflammation by administration of chrotonic oil in the external auditory canal. Afterwards the animals were randomly assigned to four groups with different treatments in: aqueous extract of *W. douradinha* 100%, aqueous extract of *W. douradinha*. 50%, *W. douradinha* 25% and solution of NaCl 0.9%. At two, four

and six days, four animals from each group were evaluated for effusion, edema and auditory canal coloration criterious; the thickness of the caudal border of the auricular pinna and weight was also evaluated, by punch of 8mm in precision scale, and also histopathological analysis. Based on the methodologies used, we evaluated the potential topical effect of the treatment through the use of *W. douradinha* aqueous extract. Among the results observed in our study, we highlighted the edema in the auditory channels treated with *W. douradinha*, where criteria for thickness by digital caliper and weight per punch sample were more relevant. These results, associated with the absence of inflammatory cells during histopathological analysis and absence of macroscopic effusion, indicate that *W. douradinha* may constitute later formulations with a probable anti-inflammatory action. Finally, the results of this experiment provide evidence that the aqueous extract of *W. douradinha* may be topically active for the treatment of experimentally induced infectious external otitis. Tumor observation in the treated ears, as well as the absence of inflammatory cells during the histopathological analyzes, denote the potential in the inflammatory agent. It is noteworthy that among all the criteria observed, the group of hearing conduits treated with WD50 showed better results than the others.

KEYWORDS:Herbal medicines, inflammation, flavonoids, otitis, dogs.

INTRODUÇÃO

A adesão ao uso de medicamentos fitoterápicos como forma de tratamento retornou às indicações médicas, sendo uma das recomendações da Organização Mundial da Saúde. Essa situação ainda que corriqueira atualmente, data de milhares de anos quando em vários relatos os homens utilizaram as plantas como forma de tratamento para as mais diversas enfermidades (PETRASKOVA et al., 2012; CACCIA-BAVA et al., 2017).

A pesquisa por medicamentos fitoterápicos com ação comprovada é veementemente estimulada, e este nicho tem crescido e vem sendo visto como uma saída para a redução de custos, diminuição de efeitos indesejáveis e alternativa para a resistência aos medicamentos alopáticos (HASENCLEVER et al., 2017). Neste contexto o Brasil possui grande destaque, pois sua flora é a mais vasta, e ainda inexplorada em grande parte (EMBRAPA, 2010). Dentre os biomas do Brasil, o pampa engloba uma flora imensa e ainda com um potencial pouco

explorado, tendo destaque para o uso empírico (LORENZI, 2008). A *Waltheria douradinha*, ou douradinha-do-campo como é conhecida popularmente, é uma planta pertencente à família Malvaceae encontrada no bioma pampa gaúcho. Esta planta possui indicações populares para o tratamento de doenças inflamatórias dermatológicas, pulmonares, tratamento de doença das vias urinárias e ainda tratamento de doenças infecciosas. Recentemente pesquisas comprovaram seu potencial através da identificação de taninos, flavonoides e saponinas (LORENZI, 2008; SCHMIDT et al., 2009; SILVA & CAVALCANTI, 2016).

Na medicina veterinária, é elevado número de animais que desenvolvem inflamação no ouvido externo. As causas da otite podem ser variadas e muitas vezes tem como consequência o desencadeamento da doença crônica com dificuldade de tratamento (FONTOURA et al., 2015). Alternativas para o correto tratamento com diminuição dos índices de recidiva da otite nos animais são essenciais, somado a isso a *W. douradinha* através de suas utilizações empíricas pode ser considerada um potencial precursor para esta situação. Neste contexto, objetivamos avaliar o efeito do tratamento da otite externa experimentalmente induzida em roedores, com extrato aquoso de *W. douradinha*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de material botânico, identificação e preparo do extrato aquoso

As amostras de *W. douradinha* foram colhidas conforme abundância na zona rural do município de Santana da Boa Vista, RS - Brasil (30°36'54"S, 53°08'11"O). A coleta foi feita em terreno de encostas, pedregoso, a cerca de 50m da mata ciliar. As foram encaminhadas ao Herbário da Universidade Federal de Pelotas para identificação e catálogo, onde a exsicata foi identificada como *Waltheria douradinha* Saint Hilarie, n^o.: 26.318.

Todo o material colhido foi encaminhado ao Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UFPel. O material foi limpo e lavado em água corrente para retirada de solo remanescente. Posteriormente as amostras foram secas em estufa com circulação de ar e pulverizadas em moinho de facas rotativo. O extrato foi confeccionado através da técnica de Ultrassom por esgotamento. Foram utilizados 25g da planta (pulverizada) com 250mL de solvente (água) a 30°C por um período de 30 minutos. Ao término foram filtrados e adicionados mais 250mL de solvente na mesma planta para uma nova extração, ao final das duas extrações os filtrados foram unidos em uma única

solução, resultando em um extrato com concentração relativa de 0,05 g.mL⁻¹, posteriormente os extratos foram secos em liofilizador.

Análise do extrato por LC-Q TOF MS

As análises por LC-QTOF MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Bidentate C18 (100 x 2.1 mm, MicroSolv Technology Corporation, Eatontown, NJ, EUA) empregando como fase A água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e como fase B acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e o seguinte programa de gradiente: 5% B (0,0 min), 0-90% B em 0.01-15 min, 90% em 15-18 min e 90-5% B em 18,01-20 min. Depois de cada injeção a coluna foi re-equilibrada por 6 minutos utilizando a composição do solvente inicial. Foi injetado 10 µL de extrato em fluxo constante de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna mantida a 40°C para todas as análises. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI positivo e negativo utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, -4000 V e +4000V; pressão do gás de nebulização (N₂), 2 bar; fluxo do gás de secagem, 8 L min⁻¹, temperatura da fonte, 180°C; colisão de RF, 150 Vpp; transfer, 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. Os espectros de massas foram adquiridos em um rango de 50 a 1200 m/z a 4 espectros/s para ambos modos de ionização. As análises MS/MS foram obtidas por fragmentação automática empregando os seguintes valores de energia de colisão: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV e usando N₂ como gás de colisão. A calibração externa foi realizada utilizando Formiato de sódio 10Mm como calibrante, cobrindo toda a faixa de aquisição de 50-1200 m/z.

Processamento dos dados e identificação dos metabólitos

Os dados brutos do LC-MS/MS foram processados usando a ferramenta “Dissect” do Data Analysis (versão 4.2, Bruker Daltonics). A estimativa da fórmula elementar foi realizada através da ferramenta SmartFormula do Data Analysis com o uso da massa experimental de alta exatidão fornecida pelo MS e do perfil isotópico. A identificação tentativa foi realizada por comparação dos valores de m/z, fórmulas moleculares e padrão de fragmentação obtidos com aqueles reportados em base de dados como: METLIN (<https://metlin.scripps.edu/index.php>), Food Database

(<http://foodb.ca/>), PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Mass bank (<http://www.massbank.jp/QuickSearch.html>).

Preparo dos tratamentos

Os tratamentos utilizados foram confeccionados através do extrato aquoso de *W. douradinha* acrescido de solução salina, quando necessário. Foram utilizados como tratamento o extrato aquoso de *W. douradinha* 100% (grupo de animais intitulado de WD100), extrato aquoso de *W. douradinha* 50% em solução salina (grupo de tratamento WD50), extrato aquoso de *W. douradinha* 25% (grupo de tratamento WD25), e por fim o tratamento controle através do uso apenas de solução fisiológica (grupo de tratamento CT).

Estudo *in vivo* com *Rattus norvegicus*

Neste experimento foram utilizados 48 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar, fêmeas, com 60 dias e peso aproximado de 180-200g, provenientes do Biotério Central da UFPel. Os animais estiveram mantidos em condições recomendadas, recebendo ração e água *ad libitum*, sendo previamente ambientados aos manipuladores.

Para o desenvolvimento da otite externa os animais foram previamente anestesiados com sulfato de atropina (5mg/kg) por via subcutânea, seguido de anestesia dissociativa com cetamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg) por via intraperitoneal. As orelhas foram inoculadas com 80µL de óleo de cróton 5% em acetona.

Os animais foram alocados aleatoriamente em grupos de 12 (n=24 orelhas/grupo). Os grupos receberam tratamento vinte e quatro horas após a indução da otite para minimizar o efeito diluente do tratamento somado ao efeito inflamatórios. Já iniciando o tratamento houve a instilação de 100µL da solução em cada conduto auditivo externo, conforme seu respectivo grupo. Os animais foram tratados por até seis dias a cada 24 horas, sendo que após dois (D2), quatro (D4) e seis dias (D6) de tratamento, quatro animais por grupo foram anestesiados, avaliados e eutanasiados, por sobredose anestésica, conforme resolução nº1000 do CFMV de 2012. Este estudo obteve o parecer favorável da Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (nº8444-2015).

Avaliação clínica

Vinte e quatro horas após a indução da otite, as orelhas foram avaliadas por vídeotoscopia utilizando o escore descrito por Marten et al. (2017). Os parâmetros avaliados se enquadram como: coloração, diâmetro luminal e efusão. A cada parâmetro foi atribuído um valor, sendo o maior escore indicando a pior condição clínica. Para coloração os parâmetros foram classificados em normal (0), vermelho (1) e vermelho intenso (2). Na avaliação do diâmetro luminal ou edema do canal externo do conduto auditivo, foram utilizadas sondas uretrais e classificados conforme a passagem da sonda nº8 (0), sonda nº6 (1), sonda nº4 (2) e incapacidade de passagem da sonda nº4 (3). A classificação da efusão no conduto auditivo externo por seco (0), úmido (1) e otorréia obstruindo o conduto auditivo (2). Ainda, foram realizadas a medição da espessura da pinna auricular no bordo caudal de cada modelo experimental, através de paquímetro digital, também para observação de edema; e após, com a dissecação do conduto auditivo externo, foram coletadas amostras por *punch* de 8mm para observação do peso através de balança analítica de precisão. Ao término da indução da otite todos animais obtiveram somatório igual ou superior a três, indicando da ocorrência de otite. Para diminuir a margem de erro clínico individual, os parâmetros foram analisados com o auxílio de três avaliadores, previamente treinados, cegados quanto aos grupos.

Histopatologia

Para a análise histopatológica, as orelhas foram dissecadas e armazenadas em formalina 10%. As amostras foram incluídas em parafina, submetidas a cortes histológicos de 5µm, coradas com eosina-hematoxilina e avaliadas em microscópio óptico (400X). Os cortes foram avaliados quanto ao epitélio do conduto auditivo (degeneração, necrose, úlcera, espongirose, hiperqueratose e acantose), indicativos de inflamação (quantidade celular, hiperemia, tipo celular e distribuição), quantidade de glândulas presentes (quantidade e alterações) e luz do conduto auditivo. Toda a análise estatística foi realizada através do teste de T bicaudal e teste de Fisher bicaudal utilizando o programa estatístico GraphPad.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a análise cromatográfica direcionada para compostos de interesse inflamatório, do total citado anteriormente, quatro foram identificados: Rutina, Kercetina, Campferol e Luteolina. Segundo a literatura, rutina é um composto com ação anti-inflamatória capaz de inibir a ciclooxigenase, e reconhecidamente capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1. Por sua vez, a Luteolina é descrita por ser capaz de inibir a atividade de leucócitos, inativar a liberação de óxido nítrico e também diminuir a expressão da enzima óxido nítrico sintetase (iNOS), além de inibir a enzima ciclooxigenase e ser também capaz de inibir citocinas pró-inflamatórias diversas. Kercetina e kaempferol são flavonoides encontrados em larga escala entre o reino dos vegetais e suas características mais marcantes estão relacionadas a significativa ação anti-inflamatória de ambos. São atributos relacionados aos dois: inibição das enzimas fosfolipase A2, inibição da lipooxigenase, ciclo-oxigenase e ainda inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima iNOS e diminuição no recrutamento de eosinófilos (COUTINHO et al., 2009; SERAFINI, PELUSO & RAGUZZINI, 2010; PÉREZ-CANO & CASTEL, 2016).

Durante as avaliações dos condutos auditivos tratados durante dois dias, apenas dois grupos diferiram significativamente na análise estatística quando comparados, o grupo controle (CT) e o grupo tratado com o extrato aquoso de *W. douradinha* 100% (WD100), sendo este último a apresentar maior peso das amostras de *punch* (Figura 1). Nesse mesmo período de tratamento os grupos que diferiram estatisticamente para o critério de espessura da porção externa da pinna foram: tratado com extrato aquoso de *W. douradinha* 25% (WD25), e CT ($p=0,006$) e WD25 e WD100 ($p=0,004$), onde o WD25 demonstrou espessura menor que os demais. No mesmo dia de tratamento, o grupo tratado com extrato aquoso de *W. douradinha* 50% (WD50) também obteve espessura menor que WD100 ($p=0,035$). Da mesma forma, os animais avaliados após os quatro dias de tratamento demonstraram diferença entre WD25 e CT ($p=0,006$) e WD25 e WD100 ($p=0,02$) onde o WD25 apresentou espessura menor que os demais (Figura 2).

É sabido que as doenças inflamatórias são acompanhadas pela liberação de diversas citocinas, as quais irão auxiliar no processo para debelar o foco causador de alteração (DEEPLYKA et al., 2014). Os sinais cardinais da inflamação foram observados neste experimento por diversos ângulos, tendo destaque para o tumor (edema) e rubor (vermelhidão). Quando observados de forma ponderada, como nos animais submetidos ao experimento, a inflamação tende a ser benéfica, auxiliando no recrutamento celular e submissão do agente causador da inflamação.

As citocinas podem ser caracterizadas como proteínas reguladoras que em condições inflamatórias podem ser induzidas e aumentar sua produção (LOGESWARI et al., 2014). Ainda, segundo Peluso et al. (2013), os flavonoides identificados no extrato aquoso de *W. douradinha*, possuem um potencial inibidor de inflamação através de citocinas que deveria ser utilizado como forma de prevenção de doenças, além do potencial benéfico para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, através da modulação da resposta imunológica, descrito por Vezza et al. (2016).

Os esteroides de forbol presentes no óleo de cróton são comprovadamente eficazes quanto ao desenvolvimento do processo inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e induzindo a síntese de metabólitos capazes de induzir a inflamação (BOUKHATEM et al., 2014). Ainda, a vasodilatação intensa seguida de eritema e migração celular são acompanhados pelo aumento de espessura (FAVACHO et al., 2011). O edema observado por diversas vezes nos animais tratados com WD100 pode nos caracterizar um possível potencial efeito benéfico de seu uso. Tubaro et al. (1985) descrevem que a migração de macrófagos e neutrófilos é estimulada pela aplicação do óleo de cróton ocorrendo um pico inflamatório em seis horas após a aplicação do produto. Somando fatos, Goel et al. (2007) citam que o óleo de cróton é um composto co-carcinogênico com um elevado potencial irritante.

Também, todo o processo inflamatório é ditado por uma amina vasoativa, a histamina, este mediador é diretamente envolvido na permeabilidade vascular atuando através da contração celular e conseqüentemente aumentando este espaço, facilitando a exsudação e migração celular para o sítio de lesão. Existem fatores que mantem essa resposta inflamatória, como a migração de leucócitos e por conseqüência a liberação de enzimas proteolíticas que poderão causar ainda mais danos através da liberação e formação de mediadores adicionais (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). Segundo os resultados obtidos por nossa análise do perfil LC-MS/MS, os compostos presentes na *W. douradinha* não possuem essa característica química de atração celular, ao contrário, possuem a capacidade de inibir fatores quimiotáticos para células relacionadas com o processo crônico (COUTINHO et al., 2009). A análise histopatológica revelou a ausência de células relacionadas com a inflamação nos animais tratados com *W. douradinha*, durante todo o período experimental de avaliação. Este fato é condizente com os dados obtidos pela análise do perfil metabólico do extrato na qual foram identificados os flavonoides Rutina, Kaempferol, Kercetina e Luteolina, os quais são descritos como potentes agentes anti-inflamatórios capazes de diminuir a liberação de

citocinas ativadoras e atrativas de células da inflamação (COUTINHO et al., 2009; SERAFINI, PELUSO & RAGUZZINI, 2010; PÉREZ-CANO & CASTEL, 2016).

Ainda que não se tenha sido observada diferença estatística significativa quanto ao critério de espessura, os grupos marcados pelo tratamento com o extrato aquoso de *W. douradinha* demonstraram possuir menor peso durante as avaliações quando comparados ao grupo controle, especialmente o grupo WD25 (figura 1). Boukhatem et al. (2014), observaram que as orelhas tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* demonstraram uma diminuição significativamente expressiva principalmente durante as primeiras 6 horas de avaliação, sendo confirmada principalmente pela histopatologia das amostras neste período.

Durante as análises clínicas, para os critérios de coloração e edema, não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento, quando comparados os mesmos dias. Sendo somente efusão o critério que demonstrou significância, mesmo assim, somente aos os seis dias de tratamento os animais do grupo WD50 diferiram do WD25 ($p= 0,021$), CT ($p= 0,009$) e WD100 ($p= 0,003$); sendo a presença de efusão menos frequente no grupo WD50 em todos os casos.

A análise histopatológica dos condutos auditivos demonstra que quando comparados ao grupo controle, onde durante todo o período experimental todos animais desenvolveram hiperplasia glandular, as demais amostras tratadas com *W. douradinha* apresentaram resultados ínfimos, sendo passível de nota para essa alteração apenas o grupo WD50 após o quarto dia de tratamento. Ainda, evidenciado em todos os grupos de maneira equivalente, a hiperplasia epitelial esteve presente durante todo o período de avaliação. Pontos de inflamação linfocitária focal também foram observados nos grupos CT e WD25, em duas amostras e em períodos distintos. O fato de não haverem evidências sobre alterações na análise histopatológica, mesmo quando em contato com os ésteres de phorbol presentes no óleo de cróton demonstra o potencial do extrato aquoso de *W. douradinha*, como o descrito pela presença de seus compostos.

Por fim, os resultados deste experimento fornecem evidências de que o extrato aquoso de *W. douradinha* pode ser topicamente ativo para o tratamento da otite externa infecciosa experimentalmente induzida. A observação de tumor nas orelhas tratadas, assim como a inexistência de células inflamatórias durante as análises histopatológicas nos denotam o potencial gerado pela *W. douradinha* em facilitar a resolução do quadro de inflamação. Vale

ressaltar que dentre todos os critérios observados o grupo dos condutos auditivos tratados com WD50 demonstrou melhores resultados frente aos demais.

REFERÊNCIAS

BOUKHATEM, M.N.; FERHAT, M.A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H.T. *Lemon grass (Cymbopogon citratus)* essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v.9, n.1, p.254-31, 2014.

CACCIA-BAVA, M.C.G.G.; BERTONI, B.W.; PEREIRA, A.M.S.; MARTINEZ, E.Z. Availability of herbal medicines and medicinal plants in the primary health facilities of the state of São Paulo, Southeast Brazil: results from the National Program for Access and Quality Improvement in Primary Care. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.22, n.5, p.1651-1659, 2017.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p.241-256, 2009.

FAVACHO, H.A.S.; OLIVEIRA, B.R.; SANTOS, K.C.; MEDEIROS, B.J.L.; SOUSA, P.J.C.; PERAZZO, F.F.; CARVALHO, J.C.T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.1, p.105-114, 2011.

FERNANDES, C.P.M.; HIJANO, A.; LIMA, C.S.; FONTOURA, E.G.; SCHRAMM, R.C.; FELIZ, 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.37, n.11, p.1270-1274, 2017.

FONTOURA, E.G. *Rosmarinus officinalis* L. e *Triticum aestivum* no Tratamento da otite externa infecciosa. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. Disponível em: <http://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPL_b354f2d6eb89e599af2096b2fb28970d>

FONTOURA, E.G.; FELIX, S.R.; FERNANDES, C.P.M.; GRECCO, F.B.; GONÇALVES, V.M.; FELIX, A.C.; NOBRE, M.O. Ensaio Toxicológico do Extrato Aquoso de *Waltheria douradinha* (douradinha do campo) em modelo *ex vivo*. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v.2, n.4, p.264-272, 2014.

FONTOURA, E.G.; VALLE, B.D.S.; COSTA, A.L.; CAPELLA, S.O.; FÉLIX, S.R.; MUELLER, E.N.; NOBRE, M.O. Otite Externa em Pequenos Animais: Artigo de Revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.12, p.398-404, 2015.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v.26, p.279-288, 2007.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C.R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D. The Brazilian phytotherapeutics industry: challenges and opportunities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, n.8, p.2559-2569, 2017.

LIMA, M.F.P.; BORGES, M.A.; PARENTE, R.S.; JUNIOR, R.C.V.; OLIVEIRA, M.E. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. **Revista Uninga Review**. v.21, n.1, p.32-39, 2015.

LOGESWARI, P.; KUMAR, V.D.; USHA, P.T.A.; KUMAR, P. *In vivo* antiinflammatory effect of emu oil (*Dromais novaehollandiae*) and virgin coconut oil (*Cocos nucifera*) on phorbol ester induced acute inflammatory model. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, n.3, 896-899, 2014.

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil. Nova Odessa-SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2008.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA. Plantas Medicinais nos Biomas Brasileiros – Pesquisas da Embrapa. Brasília, DF, Agos. 2010

PELUSO, I.; MIGLIO, C.; MORABITO, G.; IOANNONE, F.; SERAFINI, M. Flavonoids and immune function in human: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.55, n.3, p.383-395, 2013.

PÉREZ-CANO, F.J.; CASTELL, M. Flavonoids, inflammation and immune system. **Nutrients**. v.8, p.659; 2016.

PETROVSKA, B.B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v.6, n.11, p.1-5, 2012.

SERAFINI M., PELUSO I., RAGUZZINI A. Session 1: Antioxidants and the immune system
Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.69, p.273-278, 2010.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E.M.M.; BITTERN COURT, C.F.; ZANETTI, G.D.; HEINZMANN, B.M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological Studies on Brazilian Plants Used in Wound Healing. **J. Ethnopharmacology**, v.122, p.523-532, 2009.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v.18, p.385-405, 2004.

SILVA, E.E.V.; CAVALCANTI, D.S.P. Saúde & Ciência em Ação – **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v.3, n.01, 2016.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA, R. The croton oil ear test revisited. **Agents Actions**, v.17, p.347-349, 1985.

VEZZA, T.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; UTRILLA M.P.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M.E.; GALVEZ, J. 2016 Flavonoids in inflammatory bowel diseases: A review. **Annual Review of Nutrition**, v.8, n.211, p.1-22, 2016.

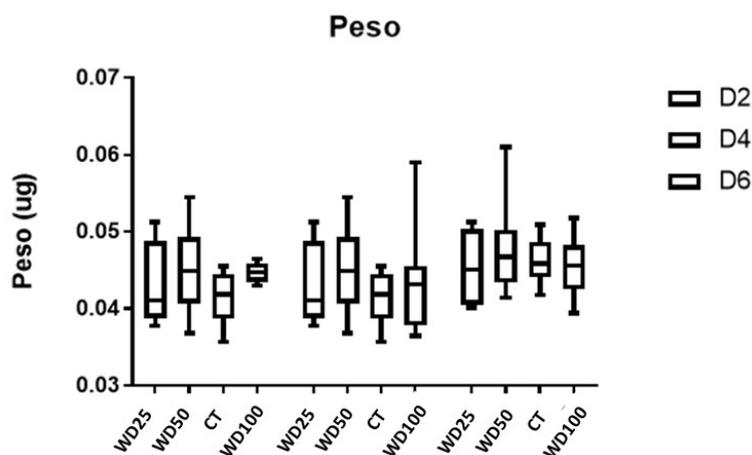


Figura 1. Peso das amostras obtidas por punch de 8mm de diâmetro do pavilhão auricular de roedores com otite externa induzida, após dois dias (D2), quatro dias (D4) e seis dias (D6) de tratamento com *W. douradinha* a 100% (WD100), 50% (WD50), 25% (WD25), ou solução fisiológica (CT).

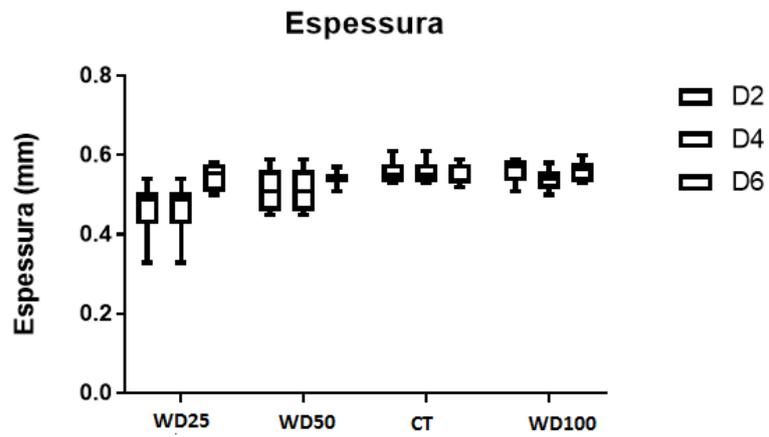


Figura 2. Espessura do bordo caudal da pinna auricular de roedores com otite externa induzida, após dois dias (d2), quatro dias (d4) e seis dias (d6) de tratamento com w. douradinha a 100% (wd100), 50% (wd50), 25% (wd25), ou solução fisiológica (ct).

4 Considerações Finais

Baseado nos resultados descritos anteriormente neste manuscrito foi possível concluir que: diversos fatores podem desencadear a otite externa, cabe ao médico veterinário identificar a doença mesmo quando não houver queixa. Com o diagnóstico no período inicial da doença o tratamento deve ser instituído de forma adequada e específica ao agente causador da doença para que assim não haja evolução e recidiva; o extrato aquoso de *W. douradinha* possui um baixo grau de toxicidade perante as análises macroscópicas e histopatológicas realizadas em modelo *ex vivo*, utilizando globo ocular de frangos; o extrato aquoso de *Waltheria douradinha* demonstrou possuir atividade citotóxica nas concentrações maiores que 1%, sendo possível identificar compostos com ação anti-inflamatória, como a Rutina, Kercetina, Kaempferol e Luteolina; por fim, foram fornecidas evidências de que o extrato aquoso de *W. douradinha* pode ser topicamente ativo para o tratamento da inflamação induzida pelo óleo de cróton.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para a condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos**. Brasília, p.1-37, 2013.

BAPTISTA, T. C. C.; REIS, C. R.; TEIXEIRA, D. R.; MOURA, M. Diagnóstico de *Malassezia* sp em ouvidos de cães e sua correlação clínica. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v.9, n.9, p.48-55, 2010.

BASSETT, R. J.; BURTON, G. G.; ROBSON, D. C.; HEPWORTH, G. Efficacy of an acetic acid/boric acid ear cleaning solution for treatment and prophylaxis of *Malassezia* sp. otitis externa. **Australian Veterinary Practitioner**, v.34, n.2, p. 79-82, 2004.

BENSIGNOR, E.; GRANDEMANGE, E. Comparison of an antifungal agent with a mixture of antifungal, antibiotic and corticosteroid agents for the treatment of *Malassezia* species otitis in dogs. **The Veterinary Record**, v.158, p.193-195, 2006.

BIAVATTI, M. W.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G.; FERNÁNDEZ, J. B.; VICTOR, S. R. PAGNOCCA, F. C; ABUQUERQUE, S.; CARACELLI, I. ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Biological activity of quinoline alkaloids from *Raulinoa echinata* and X-ray structure of Flindersiamine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.13, n.1, p.66-70, 2002.

BOUKHATEM, M. N.; FERHAT, M. A.; KAMELI, A.; SAIDI, F.; KEBIR, H. T. 2014. *Lemon grass (Cymbopogon citratus)* essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. **Libyan Journal of Medicine**, v.9, n.1, p.25431, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consultas Públicas. Áreas de Atuação. Medicamentos. Legislação. Resoluções. **Resolução – RDC nº. 17** de 24 de fevereiro de 2000. Disponível em: <<http://elegis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=1380>>. Acesso em: 28 maio 2014.

BURTON, A. B. G.; YORK, M.; LAWRENCE, R. S. The in vitro assessment of severe eye irritations. **Cosmet Toxicological**, v.19, p.471-80, 1981.

CACCIA-BAVA, M. C. G. G.; BERTONI, B. W.; PEREIRA, A. M. S.; MARTINEZ, E. Z. Availability of herbal medicines and medicinal plants in the primary health facilities of the state of São Paulo, Southeast Brazil: results from the National Program for Access and Quality Improvement in Primary Care. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.22, n.5, p.1651-1659, 2017.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.3, p.289-299, 2004.

CHIAVASSA, E.; TIZZANI, P.; PEANO, A. In vitro antifungal susceptibility of malassezia pachydermatis strains isolated from dogs with chronic and acute otitis externa. **Mycopathologia**, v.178, n.3-4, p.315-319, 2014.

CHO, Y.; JEONG, J.; LEE, H.; KIM, M.; KIM, N.; LEE, K. Virtual otoscopy for evaluating the inner ear with a fluid-filled tympanic cavity in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v.13, n.4, p.419-424, 2012.

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

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITTO, A. C.; LARA, E. H. G.; MORAES, H. P. Avaliação farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentifrício. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, n.4, p.173-82, 2006.

CORUZZI, G.; POZZOL, C.; ADAMI, M.; GRANDI, D.; GUIDO, N.; SMITS, R.; DE ESCH, I.; LEURS, R. Strain-dependent effects of the histamine H4 receptor antagonist JNJ7777120 in a murine model of acute skin inflammation. **Experimental Dermatology**, v.21, p.32-37, 2015.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p.241-256, 2009.

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; GRAEF, E.D.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. Nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1569-1573, 2005.

DUNFORD, P. J.; WILLIAMS, K. N.; DESAI, P. J.; KARLSSON, L.; MCQUEEN, D.; THURMOND, R. L. Histamine H4 receptor antagonists are superior to traditional antihistamines in the attenuation of experimental pruritus. **Journal of allergy and clinical immunology**, v.119, p.176–183, 2007.

FARIAS, M. R. Terapêutica otológica. In: **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2.ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.

FAVACHO, H. A. S.; OLIVEIRA, B. R.; SANTOS, K. C.; MEDEIROS, B. J. L.; SOUSA, P. J. C.; PERAZZO, F. F.; CARVALHO, J. C. T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae, oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.1, p.105-114, 2011.

FERNANDES, M. H. V.; SILVA, D. S.; CASTRO, C. C.; CORRÊA, R. A.; VARGAS, G. D`A.; FISCHER, G.; MOTTA, A. S.; HÜBNER, S. O. Avaliação da Citotoxicidade do Peptídeo Antimicrobiano P34. **Science and Animal Health**, v.1, n.1, p.2-10, 2013.

FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa de São Luis**, v.8, n.especial, p.90-96, 2011.

FONTOURA, Eduardo Garcia. **Rosmarinus officinalis L. e Triticum aestivum no Tratamento da otite externa infecciosa**. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

FONTOURA, E. G.; FELIX, S. R.; FERNANDES, C. P. M.; GRECCO, F. B.; GONÇALVES, V. M.; FELIX, A. C.; NOBRE, M. O. Ensaio Toxicológico do Extrato Aquoso de *Waltheria douradinha* (douradinha do campo) em modelo *ex vivo*. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v.2, n.4, p.264-272, 2014.

FONTOURA, E. G.; VALLE, B. D. S.; COSTA, A. L.; CAPELLA, S. O.; FÉLIX, S. R.; MUELLER, E. N.; NOBRE, M. O. Otite Externa em Pequenos Animais: Artigo de Revisão. **Revista Científica de Medicina Veterinária Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.12, p.398-404, 2015.

GELLER, M.; FILHO, A. B.; CUNHA, K. S. G., SLAIBI, E. B.; ABREU, C. S.; BARBOSA, J. S. S. Avaliação imunodermatológica da resposta ao propilenoglicol e ao butilenoglicol - revisão bibliográfica sistemática. **RBM: Revista Brasileira de Medicina**, v.67, n.7, p.234-239, 2010.

GIGUÈRE, S. Antimicrobial Drug Action and Interaction: Na Introduction. **Antimicrobial therapy in veterinary Medicine**. 4th. S Giguère, JF Prescott, JD Baggot, RD Walker and PM Dowling, eds. Blackwell Publishing, Ames Iowa, USA, 2006.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v.26, p.279-288, 2007.

GOTTHELF, L. N. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. **The veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.34, n.2, p.469-487, 2004.

GRESSLER, V.; STÜKER, C. Z.; DIAS, O.; DALCOL, I. I.; BURROW, R. A.; SCHMIDT, J.; WESSJOHANN, L.; MOREL, A.F. Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*. **Journal Phytochemistry**, v.69, n.4, p.994-9, 2008.

GRESSLER, Vanessa. **Estudo Fitoquímico e da Atividade Antimicrobiana de *Waltheria douradinha* Saint Hilaire**. 2006. 100f. Dissertação de Mestrado, Santa Maria, Universidade Federal de Santa Maria. Programa de Pós-Graduação em Química.

GRIFFIN, C. E. Otitis Techniques to Improve Practice. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.21, p.96-105, 2006.

GROTH, D. Identificação botânica de plantas e sementes de espécies invasoras na cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.2, n.3, p.59-95, 1980.

HASENCLEVER, L.; PARANHOS, J.; COSTA, C. R.; CUNHA, G.; VIEIRA, D.. The Brazilian phytotherapeutics industry: challenges and opportunities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, n.8, p.2559-2569, 2017.

HEINE, P. A., Anatomy of the ear. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.34, p. 379-395, 2004.

HOELZEL, S. C.; VIEIRA, E. R.; GIACOMELLI, S. R.; DALCOL, I. I.; ZANATTA, N.; MOREL, A. F. An unusual quinolinone alkaloid from *Waltheria douradinha*. **Journal Phytochemistry**, v.66, n.10, p.1163-7, 2005.

IDRUS, R. B. H.; CHOWDHURY, S. R.; MANAN, N. A. B. A.; FONG, O. S.; ADENAN, M. I.; SAIM, A. B. Aqueous extract of *Centella asiatica* promotes corneal epithelium wound healing *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.140, n.2, p.333-8, 2012.

JACKSON, L. C.; REYES, L. A. M.; CORDIÉS, M. L. H. Quinolonas y terapia antimicrobiana. **Acta Medica**, v.8, n.1, p.58-65, 1998.

KAUSHIK, V.; MALIK, T.; SAEED, S. R. Interventions for acute otitis externa. **A Revista Portuguesa de Medicina Geral**, v.28, p.234-236, 2012.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

LEITE, C. A. L. Terapêuticas tópica e sistêmica: pele, ouvido e olho. In: **Manual De Terapêutica Veterinária**. 3.ed., p.168-179, São Paulo: Editora Roca, 2008.

LIMA, M. F. P.; BORGES, M. A.; PARENTE, R. S.; JUNIOR, R. C. V.; OLIVEIRA, M. E. *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. **Revista Uninga Review**, v.21, n.1, p.32-39, 2015.

LINZMEIER, G. L.; ENDO, R. M.; LOT, R. F. E. Otitis externa. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano VII, n.12, 2009.

LOGARZO, G.; GANDOLFO, D.; CORDO, H. Biology of *Apagomerella versicolor* (Boheman) (Coleoptera: Cerambycidae) in Argentina, a candidate for biological control of cocklebur (*Xanthium spp.*). **Biological Control**, v.25, n.1, p.22-9, 2002.

LOGESWARI, P.; DINESH KUMAR, V.; USHA, P. T. A.; KUMAR, P. *In vivo* anti-inflammatory effect of emu oil (*Dromais novaehollandiae*) and virgin coconut oil (*Cocos nucifera*) on phorbol ester induced acute inflammatory mode. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v.5, n.3, 896-899, 2014.

- LORENTE, J.; SABATER, F.; RIVAS, M.; FUSTE, J.; RISCO, J.; GÓMEZ, M. Ciprofloxacin plus fluocinolone acetonide versus ciprofloxacin alone in the treatment of diffuse otitis externa. **The Journal of Laryngology & Otology**, v.128, n.7, p.591-598, 2014.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas**. Nova Odessa-SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, p.469-470, 2002.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa-SP, Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. 2008.
- LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa. **Journal Veterinary Medicine**, n.54, p.559–563, 2007.
- MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de fitomedicamentos e a política nacional de Plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.4, p.290-297, 2009.
- MALAYERI, G. Z.; S. JAMSHIDI; SALEHI, T. Z. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. **Veterinary Research Communications**, v.34, 435-444, 2010.
- MANISCALCO, C. L.; AQUINO, J. O.; PASSOS, R. F. B.; BÜRGER, C. P.; MORAES, P. C. Emprego da vídeo-otoscopia no diagnóstico de otite externa em cães. **Ciência Rural**,v.39, n.8, p.2454-2457, 2009.
- MARTINEZ, D. M.; MARQUES, M. M.; BUSSADORI, S. K.; MESQUITA-FERRARI, R. A.; PAVESI, V. C. S.; WADT, N. S.; FERNANDES. K. P. Citotoxicidade *in vitro* de extratos de arnica brasileira (*Solidago microglossa*) e arnica paulista (*Porophyllum ruderale*). **ConScientiae Saúde**,v.8, n.1, p.99-104, 2009.
- MEKIC, S.; MATANOVIC, K.; SEOL, B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. **Veterinary Record**, v.30, n.5, p.125-169, 2011.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO,EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Plantas Medicinais nos Biomas Brasileiros – Pesquisas da Embrapa**. Brasília, DF, Agos. 2010.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Portaria nº 491 de 3 de Julho de 2012**. DOU de 05/07/2012 nº 129, Seção 1, pág. 19. Disponível em: http://www.lex.com.br/legis_23490615_PORTARIA_N_491_DE_3_DE_JULHO_DE_2012.aspx

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIAS, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS. **A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, DF, 2006. [Citado 28 maio 2014] Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf

MOREL, A. F.; GEHRKE, I. T. S.; MOSTARDEIRO, M. A.; ETHUR, E. M.; ZANATTA, N.; MACHADO, E. C. S. Cyclopeptide alkaloids from the bark of *Waltheria douradinha*. **Phytochemistry**, v.51, p.473-477, 1999.

MORRIS, D. O. Medical therapy of otitis externa and otitis media. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.34, p.541-555, 2004.

MUELLER, Eduardo Negri. **Avaliação e tratamento da otite externa canina**. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

MUELLER, E. N.; GUIOT, Ê. G.; TILLMANN, M. T.; CAMPELLO-FELIX, A. O.; PEREIRA, I. C.; SCHRAMM, R. C.; NOBRE, M. O. Avaliação do efeito da lavagem do canal auditivo externo em orelhas com otite externa purulenta bilateral. **Medvep – Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.9, n.28, 147-150, 2011a.

MUELLER, E. N.; GUIOT, E. G.; WILHELM, G.; FERNANDES, C. P. M.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O. Otite externa ceruminosa e purulenta em cães. **A Hora Veterinária**, v.30, n.179, p.38-40, 2011b.

MUELLER, Eduardo Negri. **Microclima do canal auditivo de cães e efeito do *Rosmarinus officinalis* L. e do *Triticum vulgare* o tratamento da otite externa experimental**. 2011. 76f. Tese (Doutorado em Sanidade Animal) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

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

MURPHY, K. M. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.16, p.236-241, 2001.

NASCENTE, P. S.; CLEFF, M. B.; ROSA, C. S.; SANTOS, D. V.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO J. R. B. Otite externa em pequenos animais: uma revisão. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.4, n.11, p.52-59, 2006.

NJAA, B. L.; COLE, L. K.; TABACCA, N. Practical Otic Anatomy and Physiology of the Dog and Cat. **Veterinary Clinical Small Animal**, v.42, p.1109-1126, 2012.

NOBRE, M. O.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from rio grande do sul state, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, n.3, p.245-249, 2001.

NUTTALL, T.; COLE, L. K. Ear cleaning: the UK and US perspective. **Veterinary Dermatology**, v.15, n.2, p.127-136, 2004.

OECD, Guideline for the Testing of Chemicals Test No. **438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying Ocular Corrosives and Severe Irritants**. 2012.

OLIVEIRA, A.B.; BARBOSA, G. S.; VERDAM, M. C.; OHANA, D. T.; MENDONÇA, M. S.; MEIRA, R. M. S. A. Efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de trevo-roxo (*Scutellaria agrestis* A. St.-Hil. ex Benth. - Lamiaceae) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.174-181, 2014.

OLIVEIRA, E. R.; MENINI NETO, L. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do povoado de Manejo, Lima Duarte – MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p. 311-320, 2012.

OLIVEIRA, J. R. O.; PITREZ, P. M. **A importância do uso de animais para o avanço da ciência**. In FEIJÓ; A. G. S.; BRAGA, L. M. G. M.; PITREZ, P. M. C. Animais na Pesquisa e no Ensino: Aspectos Éticos e Técnicos. Porto Alegre, EdiPUCRS, p.67-73, 2010.

PELUSO, I.; MIGLIO, C.; MORABITO, G.; IOANNONE, F.; SERAFINI, M. Flavonoids and immune function in human: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.55, n.3, p.383-395, 2013.

PENNA, B.; THOMÉ, S.; MARTINS, R.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. In vitro ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in rio de janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.42, p.1434-1436, 2011.

PENNA, B.; VARGES, R.; MEDEIROS, L.; MARTINS, G. M.; MARTINS, R.; LILENBAUM, W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**, v.21, p. 292-296, 2009.

PÉREZ-CANO, F. J.; CASTELL, M. Flavonoids, inflammation and immune system. **Nutrients**, v.8, p.659; 2016.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v.6, n.11, p.1-5, 2012.

PIETSCHMANN, S.; MEYER, M.; VOGET, M.; CIESLICKY, M. The Joint in vitro action of polymyxin B and miconazole against pathogens associated with canine otitis externa from three European countries. **Veterinary Dermatology**, v.24, n.4, p.439-45, 2013.

PRICE, J. B.; ANDREWS, I. J. The in vitro assessment of eye irritancy using isolated eye. **Food and Chemical Toxicology**, v.23, n.2, p.313-315, 1985.

PRINSEN, M. K.; KOËTER, H. B. W. M. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. **Food and Chemical Toxicology**, v.31, n.1, p.69-76, 1993.

PRINSEN, M.K. The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. **Food Chemistry and Toxicology**, v.34, n.3, p.291-296, 1996.

PRINSEN, M.K. The Draize eye test and in vitro alternatives; a left-handed mirage?. **Toxicology In Vitro**. v.20, n.1, p.78-81, 2006.

PRINSEN, M. K.; SCHIPPER, M. E. I.; WIJNANDS, M. V.W. Histopathology in the isolated chicken eye test and comparison of different staining of the cornea. **Toxicology In Vitro**, v. 25, n.7, p.1475-9, 2011.

RAYMUNDO, M. M.; GOLDIM, J. R. Ética da pesquisa em modelos animais. **Revista de Bioética**, v.10, n.10, p.31-44, 2002.

RICARDO, M. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; MARTÍNEZ-VITELA, C.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Topical Anti-Inflammatory Effects of Isorhamnetin Glycosides Isolated from *Opuntia ficus-indica*. **Biomedical Research International**,2015.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo Entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.8, n.3, p.317-320, 2003.

ROSSER, E. J. Jr., Causes of otitis externa. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.34, p.459–468, 2004.

ROSYCHUK & LUTTGEN. Olhos, ouvidos, nariz e garganta. In: **Tratado de Medicina Interna Veterinária Doenças do Cão e do Gato**. 5.ed., p. 1048-1056, Rio de Janeiro:Editora Guanabara Koogan, 2005.

SÁ, R.C.S.; ANDRADE, L. N.; DOS REIS BARRETO DE OLIVEIRA, R.; DE SOUSA, D. P. A Review on Anti-Inflammatory Activity of Phenylpropanoids Found in Essential Oils. **Molecules**, v.19, p.1459-1480; 2014.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**,v.122, n.3, p.523-32, 2009.

SCHUTTE, K.; PRINSEN, M. K.; MCNAME, E.; ROGGERBAND, R. The isolated chicken eye test as a suitable *in vitro* method for determining the eye irritation potential of household cleaning products. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.54, n.3, p.272-81, 2009.

SCMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; BITTERN COURT, C. F.; ZANETTI, G. D.; HEINZMANN, B. M.; LAUFER, S.; MERFORT, I. Biological Studies on Brazilian Plants Used in Wound Healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.523-532, 2009.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Diseases of eyelids, claws, anal sacs, and ears**.In: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology. 6.ed., p.1204-1231, Philadelphia: Editora W.B. Saunders Company, 2001.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Session 1: Antioxidants and the immune system Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.69, p.273-278, 2010.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v.18, p.385-405, 2004.

SILVA, E. E. V.; CAVALCANTI, D. S. P. Saúde & Ciência em Ação – **Revista Acadêmica do Instituto de Ciências da Saúde**, v.3, n.01, 2016.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIAS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.618-626, 2008.

SIMÕES, A. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEGMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no rio grande do sul**. Porto Alegre, Ed da UFRGS, p. 56-57, 1986.

TAKAKI, I.; BERSANI-AMADO, L. E.; VENDRUSCOLO, A.; SARTORETTO, S. M.; DINIZ, S. P.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R.K.N. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in experimental animal models. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.4, p.741-746, 2008.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA, R. The croton oil ear test revisited. **Agents Actions**, v.17, p.347-349, 1985.

VEZZA, T.; RODRÍGUEZ-NOGALES, A.; ALGIERI, F.; UTRILLA, M. P.; RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E.; GALVEZ, J. Flavonoids in inflammatory bowel diseases: **Annual Review of Nutrition**, v.8, n.211, p.1-22, 2016.

VOGET, M.; ARMBRUSTER, M.; MEYER, M. Antibiotic plasma levels in dogs with otitis external treated routinely with various tropical preparations. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.125, n.11-12, p. 441-448, 2012.

WANG, J.; RUAN, Y.; CAI, Q.; HAIXING, X.; YUN-XIA, W. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the wound healing properties of *Siegesbeckia pubescens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.134, n.3, p.1033-8, 2011.

YAP, P.S.X.; YIAP, B. C.; PING, H. C.; LIM, S. H. E. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. **The Open Microbiology Journal**, v.8, p.6-14, 2014.

ZONGO, F.; RIBUOT, C.; BOUMENDJEL, A.; GUISSOU, I. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L. (syn. *Waltheria americana*): a review. **Journal of Ethnopharmacol**, 2013 Jun 21; v.148, n.1, p.14-26, 2013.

Anexos

Pelotas, 14 de janeiro de 2016.

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profa. Márcia de Oliveira Nobre

Departamento de Clínicas Veterinárias – Faculdade de Veterinária

Senhora Professora:

A *CEEA* analisou as correções feitas no projeto intitulado: “**Caracterização Toxicológica e Funcional do Extrato Aquoso de LCEA206**” processo nº23110.008444/2015-36, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 8444-2015**).

Vigência do Projeto: 15/01/2016 a 01/01/2017

Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/Wistar

Nº de animais: 60

Idade: 60 dias

Sexo: Fêmeas

Origem: Biotério Central - UFPel



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016

Assinatura do Professor Responsável: _____

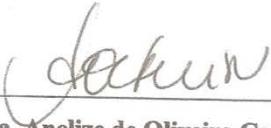
Pelotas, 04 de abril de 2016

Certificado

Certificamos que a solicitação de adendo (aumento no número de animais) à proposta intitulada "**Caracterização toxicológica e funcional do extrato aquoso de LCEA206**", registrada com o nº CEEA 8444/2015, 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 21/03/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	05/04/2016 a 01/01/2017	
Espécie/linhagem/raça	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar	
Nº de animais	Acréscimo de 18	
Idade	60 dias	
Sexo	Fêmeas	
Origem	Biotério Central - UFPEL	

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____ / ____ /2016

Assinatura do Professor Responsável: _____