



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

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

Risciela Salardi Alves de Brito^{*1} , Giulia Batista de Freitas² , Antônio Gonçalves de Andrade Júnior² , Rogério Antônio Freitag² , Renato Vianna³ , Fábio Raphael Pascoti Bruhn² , Sérgio Jorge² , Márcia de Oliveira Nobre² 

1 Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil

2 Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

3 Universidade Católica de Pelotas (UCPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

*autor correspondente: riscielaalves@unipampa.edu.br

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

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

Abstract: The objective was to evaluate the efficiency of three otological solutions based on plant extracts and adjuvants in treating canine otitis externa. Three different ear solutions were developed, composed of ethanolic extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, and Tris-EDTA, 1004, consisting of ethanolic extracts of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, and n-acetylcysteine, 1005 composed of *Triticum aestivum*, *Bixa orellana*, n-acetylcysteine, and Tris-EDTA, as a control group a commercial product was used. The study used 64 dogs with clinical signs of external otitis. They were randomly divided into four groups, and all animals were treated once a day for seven days. During the otological examination carried out on days D0, D3, and D7, clinical signs of otalgia, pruritus, odor, erythema,

Recebido: 06 de março, 2024. Aceito: 14 de junho, 2024. Publicado: 04 de outubro, 2024.

and amount of cerumen were evaluated. Samples were collected for bacterial and fungal culture and cytology before and after treatments. After the evaluation, each clinical sign received a score from 0 to 3, of which 0 was considered absent, and 3 was the most severe form of manifestation; from this evaluation, a sum was generated per animal and group during each evaluation day. At the end of treatment, all evaluated compounds effectively reduced clinical signs and microorganisms involved in cases of canine external otitis.

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

1. Introdução

As otites externas em cães podem se apresentar como crônicas e recidivantes. Muitas vezes a fase inicial da otite, com sinais clínicos mais brandos, pode passar despercebida pelo tutor, o que determina a progressão e evolução da doença. A terapia tópica é a mais indicada e a mais utilizada nos quadros de otite externa. Nesse sentido é difícil encontrar produtos dentro do mercado veterinário que não sejam uma associação de antibióticos, antifúngicos e glicocorticóides, dificultando a escolha com base em análises citológicas e clínicas, obrigando a utilização dessa combinação de compostos mesmo quando seu uso é desnecessário estimulando assim a resistência microbiana e o uso desnecessário de glicocorticóides⁽¹⁾.

O tratamento tópico frequente com o uso de antibióticos tem gerado preocupação devido aos casos frequentes de resistência bacteriana de diversas cepas comumente isoladas de pacientes caninos com otite externa. O uso prudente de antimicrobianos é importante do ponto de vista da saúde pública, considerando que bactérias ou genes de resistência podem ser transmitidos aos humanos⁽²⁾.

A otite externa canina é considerada uma das principais afecções dentro da dermatologia veterinária, sendo caracterizada pela inflamação do conduto auditivo externo, ocasionando sinais clínicos agudos como otalgia, odor, eritema, prurido e otorrêia, podendo evoluir para manifestações crônicas como hiperqueratose, hiperpigmentação e estenose⁽³⁾.

Possui origem multifatorial, apresentando fatores predisponentes, primários e perpetuantes. Os fatores predisponentes são responsáveis por aumentar a predisposição em desenvolver o quadro, como a raça, condutos auditivos com presença de pelos, morfologia pendular e distribuição de glândulas sebáceas. Os fatores primários são responsáveis por efetivamente causar a otite, dentre as causas mais frequentes encontram-se doenças alérgicas, como a atopia, alergia alimentar e Dermatite Alérgica à Picada de Ectoparasitas (DAPE), doenças endócrinas e doenças imunomediadas. Os fatores perpetuantes são responsáveis pela severidade do quadro e o insucesso na terapia dentre eles os mais frequentes são a levedura *Malassezia pachydermatis*, bactérias cocos gram positivas como *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus aureus* e gram negativas como *Pseudomonas spp* e *Proteus spp*⁽⁴⁾.

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

2. Metodologia e métodos

2.1. Obtenção dos extratos vegetais

Para a elaboração dos produtos foram utilizados os extratos etanólicos na concentração de 50mg/mL das plantas *Bixa orellana* (Urucum) e *Triticum aestivum* (Trigo). As sementes *in natura* das plantas foram obtidas comercialmente da empresa Linea Verde Alimentos Ltda, a qual possui certificação de origem. Posteriormente, foram trituradas em moinho de facas e pesadas (25g), sendo acondicionadas em um balão de Erlenmeyer, junto da adição de 500 ml de Etanol PA ao balão. Logo depois, a mistura foi filtrada e levada a cuba ultrassônica digital Unique sendo sonificada por 30 minutos. Ao final da extração o balão foi levado ao rotaevaporador para remoção do solvente, depois, o extrato foi armazenado em frasco âmbar e refrigerado a uma temperatura entre 2°C e 4°C até sua utilização.

2.2. Formulação das soluções otológicas

As soluções otológicas foram preparadas a partir dos extratos etanólicos de urucum e trigo (50mg/mL), sendo a primeira solução denominada 1003, composta pelos extratos etanólicos acrescidas de Tris-EDTA, Polietilenoglicol(PEG) 400 e PEG 4000, a segunda denominada 1004, composta pelos mesmos extratos etanólicos N-Acetilcisteína, PEG 400 e PEG 4000. A última solução 1005, composta pelos extratos etanólicos acrescidos da combinação de Tris-EDTA, N-acetilcisteína, PEG 400 e PEG 4000. Os produtos estão em processo de reivindicação de patente com depósito no INPI.

2.3. Estudo em cães com otite naturalmente desenvolvida

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética para Experimentação Animal (CEEA 23110.051174/2019.15). Para o experimento foram selecionados 64 cães resgatados e alocados em uma ONG no município de Capão do Leão – RS. Para a inclusão no estudo foram analisados a presença de pelo menos três dos seguintes sinais clínicos compatíveis com otite externa canina: eritema, exsudato, prurido, otalgia, edema, odor e erosão/úlceras. Neste estudo, não foi possível identificar a causa primária de cada caso avaliado. Foram realizadas avaliações por videoendoscopia de todos animais, sendo excluídos do estudo cães com presença de nódulos ou massas no do conduto auditivo e fêmeas prenhas.

Para o tratamento os cães foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos, Grupo 1003 (Extratos etanólicos de urucum, trigo e Tris-EDTA), Grupo 1004 (Extratos etanólicos de urucum, trigo e N-Acetilcisteína), Grupo 1005 (Extratos etanólicos de urucum e trigo, Tris-EDTA e N-acetilcisteína) e Grupo Controle positivo, produto comercial a base de clotrimazol, sulfato de gentamicina e valerato de betametasona, Os avaliadores desconheciam qual era o produto utilizado para o tratamento. Os animais foram tratados uma vez a cada 24 horas, durante 7 dias, primeiramente a orelha e a parte externa do conduto auditivo foi higienizada com auxílio de gaze com o respectivo tratamento. Após foi instilado no conduto auditivo o respectivo produto na seguinte dosagem: 4 gotas para o tratamento de cães com menos de 15 kg e 8 gotas para cães com mais de 15 kg

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

2.4. Análise citológica

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

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

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

2.5. Atividade antimicrobiana

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

2.6. Análise estatística

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

3. Resultados e discussão

Os animais avaliados neste estudo foram classificados de acordo com escore de sinais clínicos, já que por se tratar de um experimento clínico com animais naturalmente acometidos e a otite externa ser multifatorial com diferentes manifestações clínicas e diversos agentes, não sendo assim, possível padronizar todos esses critérios dentro de um grupo.

Os resultados nos indicaram que o produto 1005 apresentou melhor eficácia que os demais na redução dos sinais clínicos de otite externa. No teste de Kruskal-wallis todos os grupos apresentaram melhora em relação a intensidade dos sinais clínicos. Entretanto, o grupo tratado com o produto 1005, foi o que mais reduziu os sinais clínicos ao fim do tratamento, apresentando diferença estatística ($p= 0,03$) dos demais grupos. Através do teste de Friedman foi possível avaliar que todos os grupos apresentaram diferença estatística ($p<0,05$) entre o início e o fim do período experimental, demonstrando que todos os animais tratados melhoraram durante o tratamento (Figura 1).

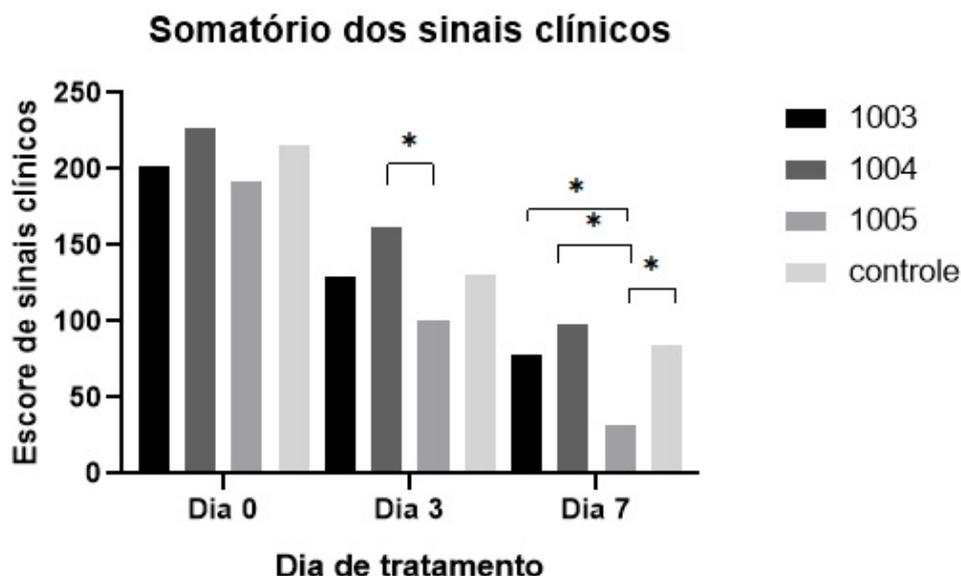


Figura 1. Demonstração do somatório dos sinais clínicos e diferenças estatísticas das análises clínicas realizadas dos cães tratados com os produtos 1003, 1004, 1005 e grupo controle. O símbolo (*) representa a diferença estatística entre os grupos avaliados.

Quanto aos sinais clínicos específicos, assim como o somatório, diminuíram progressivamente, porém, observou-se que o prurido não apresentou diferença estatística entre

os grupos. Já para o odor ($p < 0,05$) e exsudato ($p < 0,05$) notou-se uma melhora significativa do grupo 1005 em comparação aos demais grupos testados (Figura 2). Os sinais clínicos de edema, erosão e úlcera, por serem menos frequentes e envolvidos em quadros mais graves de otite, estavam presentes em um pequeno número de orelhas, os quais reduziram progressivamente com todos os tratamentos testados, portanto, não foi possível fazer uma comparação entre os grupos.

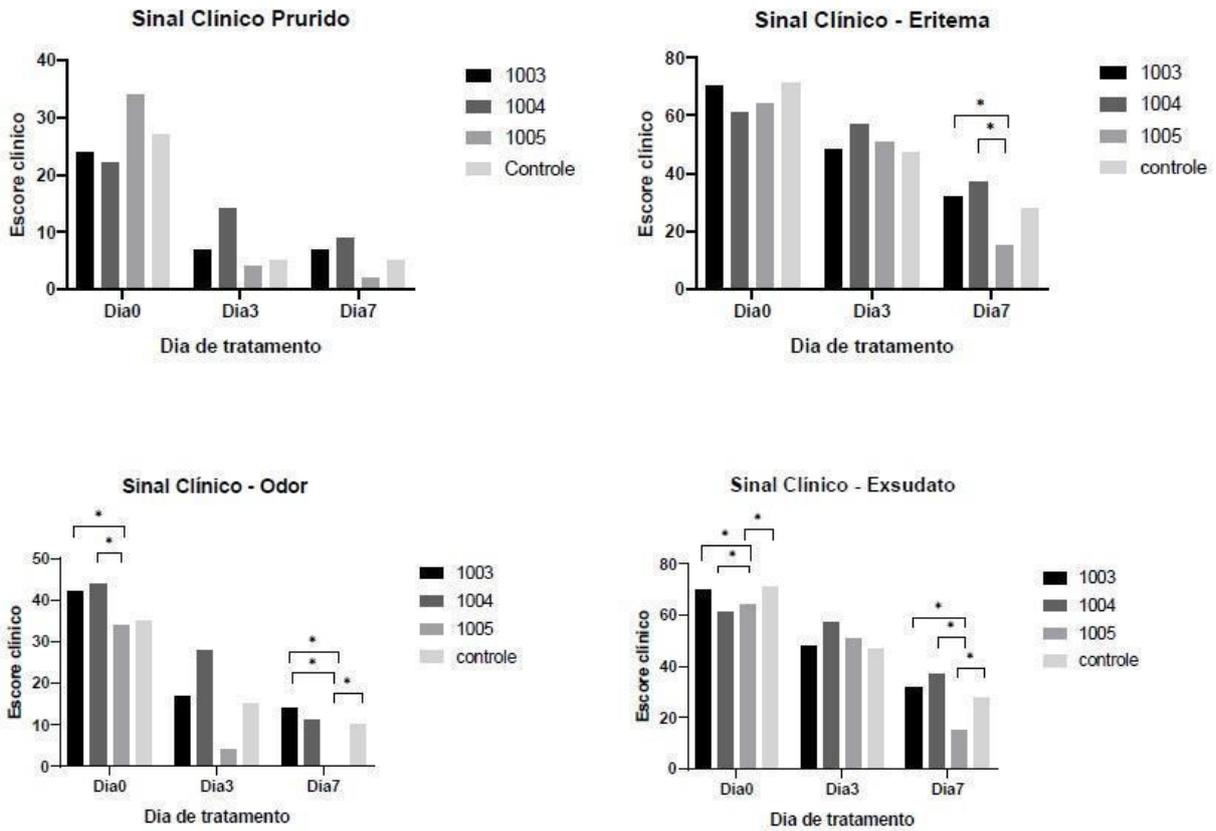


Figura 2 Demonstração do somatório dos sinais clínicos a) Prurido, b) Eritema, c) Odor e d) Exsudato, dos grupos tratados com os produtos 1003, 1004, 1005 e grupo controle. As letras representam as diferenças estatísticas entre as coletas e o símbolo (*) representam a diferença estatística entre os grupos.

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

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

Isolamento de *Malassezia pachydermatis*

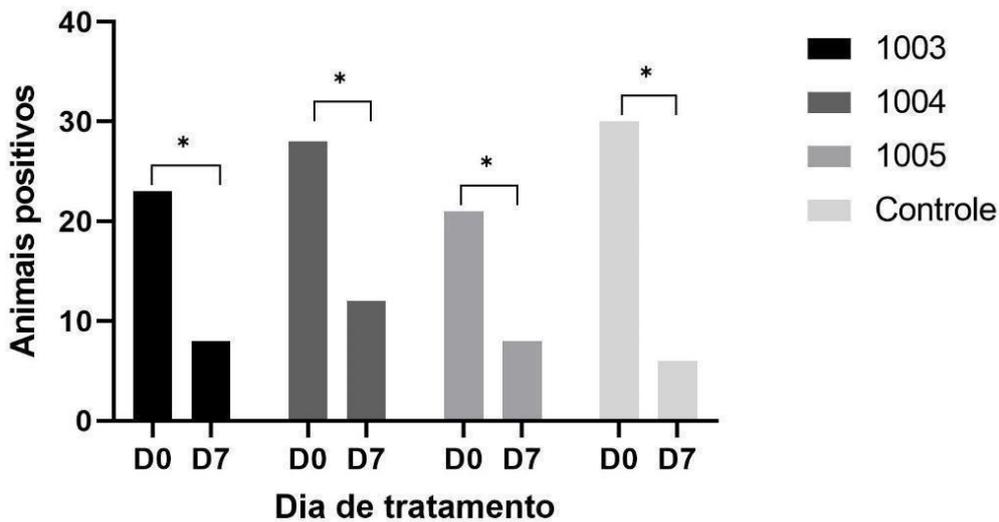


Figura 3 Demonstração dos isolamentos e resposta ao tratamento dos diferentes grupos teste e controle, frente a levedura *Malassezia pachydermatis* isoladas de cães com otite externa. O símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre o início (D0) e fim do tratamento (D7).

Isolamento Bacteriano

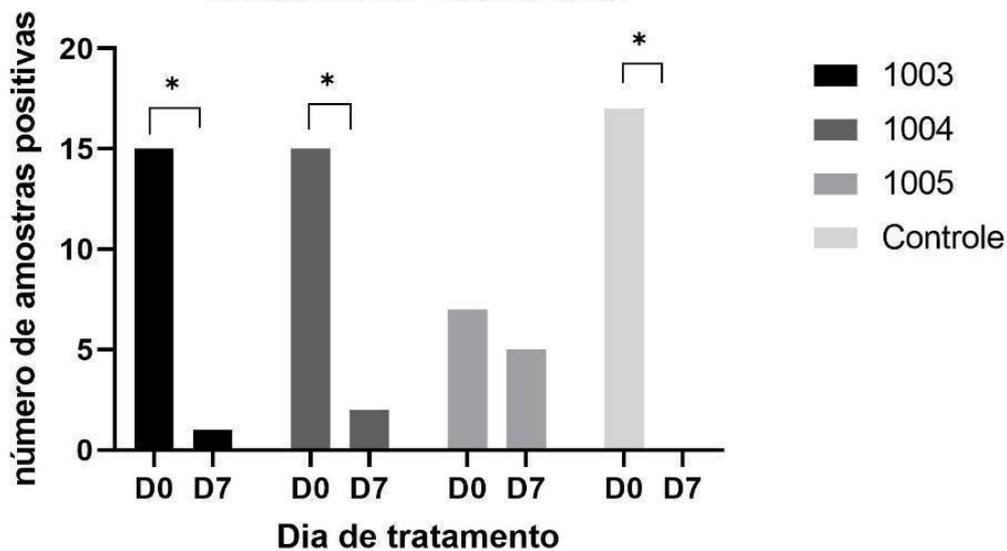


Figura 4 Demonstração dos isolamentos e resposta ao tratamento dos diferentes grupos teste e controle, frente a bactérias isoladas de cães com otite externa. O símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre o início e fim do tratamento.

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

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

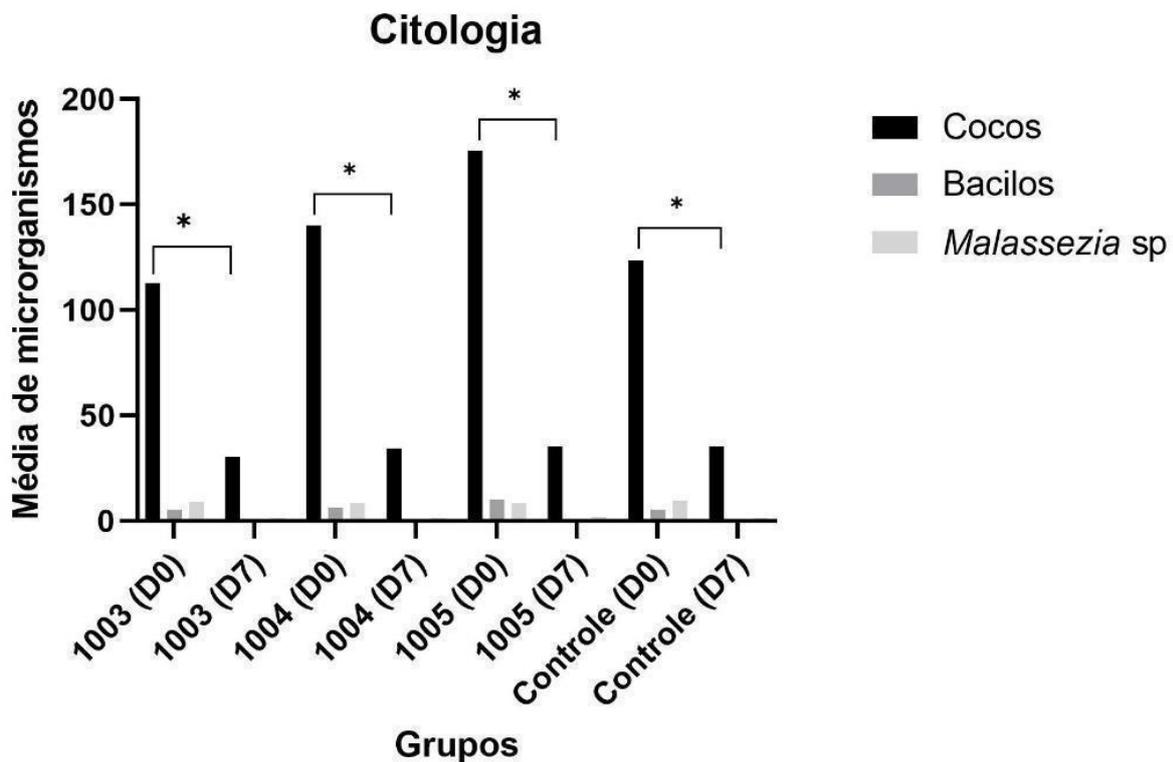


Figura 5 Demonstração da média de microrganismos cocos, bacilos e leveduras *Malassezia sp.*, avaliados nas amostras citológicas de cães com otite externa canina, tratados com os produtos teste (LFCO 1003, 1004, 1005 e controle), o símbolo (*) demonstra a diferença estatística entre as coletas.

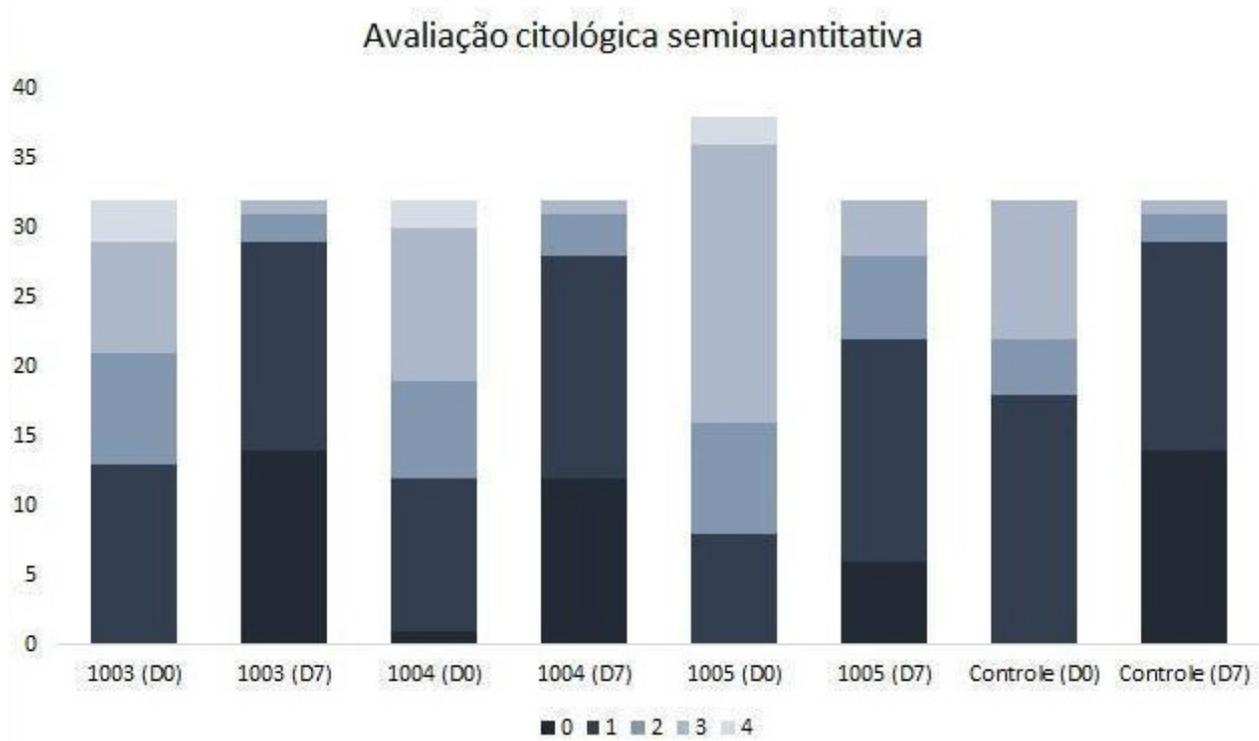


Figura 6 Demonstração da análise citológica semiquantitativa de cães com otite externa tratados com os grupos teste e grupo controle. As barras empilhadas demonstram o número de canais auditivos com diferentes pontuações.

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

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

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

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

4. Conclusão

Os compostos 1003, 1004 e 1005 foram eficazes para a redução dos sinais clínicos e na quantidade de microrganismos envolvidos em casos de otite externa canina, demonstrando eficiência equiparada com um produto comercial. As soluções desenvolvidas neste estudo são um tratamento viável para casos de otites leves ou iniciais.

Declaração de conflito de interesse

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

Contribuições do Autor

Conceitualização: R.S.A. Brito; Investigação: AGA Júnior e RSA Brito; Metodologia: R.A. Freitag, R. Vianna e R.S.A. Brito; Curadoria de dados: F.R.P. Bruhn; Administração de projetos: M.O. Nobre e S. Jorge; Redação (esboço original, edição e revisão): G.B. Freitas e R.S.A. Brito.

Referências

1. Bajwa J. Canine otitis externa - Treatment and complications. The Canadian veterinary journal = La revue vétérinaire Canadienne. 2019; 60 (1):97-99. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6294027/>
2. Marconi C. Pseudomonas aeruginosa in otitis externa in companion animals: resistance to antimicrobials. Master's Dissertation in Integrated Veterinary Medicine, University of Lisbon, Lisbon, 47p. 2019. <http://hdl.handle.net/10400.5/17738>
3. Hlinica KA. Dermatology of Small Animals: Color Atlas and Therapeutic Guide. 3rd ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 632p.
4. Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. Veterinary Dermatology. 2007; 18 (5):341-347. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2007.00619.x>
5. Budach SC, Mueller RS. Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. Veterinary Dermatology. 2012; 23(5):426-e80. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01075.x>
6. Capella SO, Krug F, Tillmann MT, Vianna R, Aranha BC, Chaves FC, Freitag RA, Bruhn FRP, Fernandes CG, Nobre MO. Therapeutic potential of drugs with active ingredients of *Bixa orellana* L. and *Triticum aestivum* in the treatment of thermal lesions. Research, Society and Development. 2020; 9(3):29. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i3.2379>
7. Fernandes C, Hijano A, Lima C, Fontoura EG, Schramm RC, Félix SR, Nobre MO. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to assess the effect of an aqueous extract of *Triticum aestivum* on canine outer ear inflammation. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2017; 11(37):1270-1274. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2017001100012>
8. Capella S, Tillmann MT, Félix AOC, Fontoura EG, Fernandes CG, Freitag RA, Santos MAZ, Félix SR, Nobre MO. Healing potential of *Bixa orellana* L. in cutaneous wounds: a study in an experimental model. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2016; 68(1):104-112. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8374>
9. Brito RSA, Capella SO, Hoffmann JF, Freitag RA, Pascoti Brum FR, Nascente PS, Costa Schramm R, Vianna R, Jorge S, Nobre MO. Evaluation of plant extracts in pharmaceutical formulations in the treatment of canine otitis externa. Medicina Veterinária (UFRPE). 2021; 15(4):332-339. Disponível em: <https://doi.org/10.26605/medvet-v15n4-3601>

10. Poma-Castillo L, Espinoza-Poma M, Mauricio F. Antifungal activity of ethanol-extracted *Bixa orellana* (L) (Achiote) on *Candida albicans*, at six different concentrations. The Journal of Contemporary Dental Practice. 2019; 20(10):1159-1163. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31883250/>
11. Hussain MS, Singh M, Kumar B, Tewari D, Mansoor S, Ganesh N. Antimicrobial activity in ethanolic extracts of *Bixa orellana* L., *Simarouba glauca* DC and *Ocimum tenuiflorum* L. collected from JNCH herbal garden. World Journal of Pharmaceutical Research. 2020; 9(4):650-663. Disponível em: <https://doi.org/10.20959/wjpr20204-16654>
12. Chan WY, Khazandi M, Hickey EE, Page SW, Trott DJ, Hill PB. In vitro antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. Veterinary Dermatology. 2019; 30(2):133-138. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vde.12712>