

***Waltheria douradinha*: ESTUDO CITOTÓXICO E ANTI-EDEMATOGÊNICO**

Waltheria Douradinha: CYTOTOXIC AND ANTIEDEMATOGENIC

**E. G. FONTOURA¹, E. S. BIERHALS², S. R. FELIX³, R. A. FREITAG⁴, G. FISCHER⁴,
M. O. NOBRE⁴**

RESUMO

Objetivo: avaliar o efeito citotóxico *in vitro* causado pela exposição de células ao extrato aquoso de *Waltheria douradinha*, além de testar o potencial anti-inflamatório tópico em modelo experimental de inflamação. **Material e métodos:** Para citotoxicidade foram utilizadas concentrações a partir de 10% do extrato aquoso seguindo uma sequência de diluições. A leitura das placas se procedeu com corante de vermelho neutro em espectrofotômetro. O ensaio anti-inflamatório ocorreu por indução da inflamação no conduto auditivo de ratos induzidos por óleo de cróton 5% em acetona. Os animais foram alocados em grupos: extrato aquoso de *W. douradinha* 100%, 50% e 25%, e grupos controle positivo (betametasona), e controle negativo (solução fisiológica de NaCl 0,9%). O potencial anti-inflamatório dos tratamentos foi avaliado através de medição do bordo caudal da pinna auricular, assim como pelo peso de amostra obtida por *punch*. Também foram pesquisados compostos com ação anti-inflamatória comprovada através de análise cromatográfica. **Resultados:** 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%. Para o ensaio anti-inflamatório, os roedores tratados com extrato aquoso de *W. douradinha* 50% equivaleram ao grupo controle com anti-inflamatório alopatóico. Também foram identificados compostos flavonoides de ação anti-inflamatória: Luteolina, Kercetina, Kaempferol e Rutina. **Conclusão:** o extrato aquoso de *W. douradinha* possui atividade citotóxica nas concentrações maiores que 1%, além demonstrar possibilidades para efeito edematogênico quando administrado na orelha externa de ratos induzidos a otite com óleo de cróton.

PALAVRAS-CHAVE: Células. Cróton. Douradinha-do-campo. Otite.

SUMMARY

Objective: To evaluate the *in vitro* cytotoxic effect caused by cell exposure to *Waltheria douradinha* aqueous extract, and to test the topical anti-inflammatory potential in an experimental model of inflammation. **Material and methods:** For cytotoxicity, concentrations from 10% of the aqueous extract were used following a dilution sequence. Plates were read with red-neutral dye in spectrophotometer. The antiinflammatory assay was by induction of inflammation in the ear canal of rats induced by 5% cróton-oil in acetone. The animals were allocated in groups: aqueous extract of *W. douradinha* 100%, 50% and 25%, and positive control groups (betamethasone) and negative control (0.9% NaCl physiological solution). The anti-inflammatory potential of the treatments was evaluated by measuring the caudal edge of the pinna, as well as the sample weight obtained by punch. Compounds with proven anti-inflammatory action through chromatographic analysis were also investigated. **Results:** when compared to control, cells exposed to concentrations from 0.1% to 1% of the aqueous extract did not show cytotoxicity, being characterized as toxic concentrations of 10, 5 and 1%. For the anti-inflammatory assay, rodents treated with 50% aqueous extract of *W. douradinha* were equivalent to the control group with allopathic anti-inflammatory. Also flavonoid compounds of anti-inflammatory action were identified: Luteolin, Kercetin, Kaempferol and Rutina. **Conclusion:** The aqueous extract of *W. douradinha* has cytotoxic activity at concentrations greater than 1%, besides demonstrating possibilities for effect as an edematogenic compound when administered to the outer ear of croton-oil induced rats.

KEY-WORDS: Cells. Cróton. Douradinha-do-campo. Otitis.

¹ Centro Universitário da Região da Campanha – URCAMP, Av. Tupy Silveira, 2099/ CEP 96400-110. Autor para correspondência: eduardogarcia@urcamp.edu.br

² Universidade Federal de Pelotas.

³ Instituto Federal Sul-Rio-Grandense.

⁴ Universidade Federal de Pelotas

INTRODUÇÃO

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, especialmente com referência ao uso de substâncias naturais e a redução de efeitos colaterais indesejáveis (SÁ et al., 2014). O processo inflamatório é caracterizado como parte da resposta biológica contra alterações celulares, muitas vezes relacionada com a presença de microrganismos invasores (OLIVEIRA et al., 2014). Os principais exemplos do efeito relacionado aos anti-inflamatórios comerciais são à inibição de citocinas ativadoras da inflamação (interleucinas, fator de necrose tumoral, quimiocinas e as cicloxigenases). Dentre esses, alguns possuem atividades antimicrobiana inespecíficas, lesando microrganismos exógenos e células do hospedeiro. Contudo, a exacerbação dos processos inflamatórios pode ser lesiva quando em demasia (MARILENA et al., 2015).

A utilização empírica nos leva a crer que o poder anti-inflamatório das plantas ainda é pouco estudado, contudo, o potencial tóxico de uma planta não pode ser negligenciado. O uso indevido das plantas pode acarretar a danos graves, tanto locais como sistêmicos (CACCIA-BAVA et al., 2017, HASENCLEVER et al., 2017).

A *Waltheria douradinha* (popular 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). As indicações populares de utilização vão desde o tratamento de processos inflamatórios, tratamento cicatrizante de feridas cutâneas, expectorante, antimicrobiana, desordens de pressão arterial, ou ainda neoplasmas (LORENZI; MATOS, 2002; SCHMIDT et al., 2009). Baseados nessas premissas, o objeto de nosso estudo foi 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*, assim como testar o potencial anti-inflamatório tópico do extrato aquoso de *W. douradinha* em modelo experimental de inflamação induzida no conduto auditivo de roedores.

MATERIAL 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 exsiccata foi identificada como *Waltheria douradinha* Saint Hilarie, n°: 26.318.

Todo o material colhido foi encaminhado ao Laboratório de Óleo-Química e Biodiesel do

Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal de Pelotas. O material foi limpo e lavado em água corrente para retirada de solo remanescente. Posteriormente as amostras foram secas em estufa de ar e trituradas em moinho de facas rotativo. O extrato foi confeccionado através do uso da planta total, pela técnica de Ultrassom por esgotamento. Foram utilizados 25g da planta (pulverizada) com 250mL de solvente (água) a 30°C. 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.

Análise Cromatográfica

Uma alíquota do extrato aquoso de *W. douradinha* foi encaminhada para caracterização, a fim de elucidar os possíveis componentes majoritários na amostra utilizada. O procedimento foi realizado no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da UFPEL. Através das técnicas de ionização positiva e negativa em sistema de cromatografia líquida de ultra performance (UHPLC-MS). Foram pesquisados os compostos: Santina, Ernenina, Nepetina, Leceosina, Kercetina, Campferol, Miricetina, Aglicona, Apigenina, Morina, Rutina, Galangina, Luteolina, Crisina, Flavonol.

Determinação do efeito citotóxico

Foram utilizadas células da linhagem MDBK e VERO. Tais células foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM), contendo 1% de solução antimicrobiana e 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, sendo finalizado este período e a confirmação da formação da monocamada confluyente nos poços, procedeu-se então a retirada do MEM.

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 espectrofotômetro de placas, com o comprimento de onda de 492nm.

Determinação da atividade anti-inflamatória em modelo agudo

Para este ensaio foram utilizados trinta ratos (*Rattus norvegicus*), fêmeas, com aproximadamente 60 dias, provenientes do Biotério Central da UFPEL. Os animais foram mantidos em condições recomendadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, recebendo ração e água *ad libitum*, ambiente com temperatura controlada (23±2°C), ciclo de claro/escuro de 12/12 horas e alojados aos pares em caixas com as dimensões de 25x48x34.

Para a indução da inflamação aguda os animais foram anestesiados brevemente através de isoflurano ao efeito. O conduto auditivo esquerdo de cada animal recebeu 80µL de óleo de cróton 5% em acetona, para o conduto auditivo direito foi instilado apenas o veículo (acetona em mesma quantidade). Este diferencial de indução foi utilizado como um dos métodos comparativos entre os tratamentos. A fórmula [(edema da orelha do grupo de controle) - (edema da orelha do grupo tratado)] / [edema da orelha do grupo de controle] x 100; adaptada de CORUZZI et al. (2015). Transcorridos trinta minutos após a indução da inflamação, cada peça experimental (conduto auditivo) recebeu a instilação de 100µL da solução estudada. Os animais foram alocados em grupos de seis indivíduos (n = 12 orelhas/grupo): um grupo recebendo extrato aquoso de *W. douradinha* 100% (Ext100), um grupo recebendo extrato aquoso de *W. douradinha* 50% em solução salina (Ext50), um grupo tratado com extrato aquoso de *W. douradinha* 25% em solução salina (Ext25), ainda, um grupo controle positivo, com anti-inflamatório tóxico a base de betametasona (Cp – padrão ouro), e por fim, um grupo controle negativo, tratado com solução fisiológica de NaCl 0,9% (Cn). As concentrações utilizadas neste estudo, seguem padrão de determinação após estudos *ex vivo*. Após seis horas da indução da inflamação os animais foram anestesiados para avaliação de edema do pavilhão auricular por medicação com paquímetro digital da borda caudal. Após, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica, conforme as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. As orelhas foram dissecadas, onde se coletaram amostras do bordo caudal do pavilhão auricular através de *Punch* de 8mm. Tais segmentos foram pesados em balança analítica de precisão.

Para a avaliação do efeito anti-inflamatório, após a verificação de normalidade através do teste de *Shapiro-Wilk*, foi realizada análise estatística por teste de

T Student utilizando o *software* GraphPad. Este experimento obteve parecer favorável da Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, com o parecer nº8444-2015.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Efeito citotóxico

Este ensaio nos possibilitou a observação da toxicidade gerada pelo extrato aquoso de *W. douradinha* quando em contato direto com células, em ambas linhagens. A incorporação do corante pelas células foi lida e demonstrada em valores de absorvância por espectrofotômetro de placas, os índices demonstrados pela coluna controle foram adotados como padrão 100%, índices superiores a 90% adotados como não citotóxicos, conforme padronizados anteriormente (CAPELLA et al., 2016). 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). 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.) (MAYER et al. 1982, OLOWA & NUÑEZA 2013, NONDO et al. 2015). Novos estudos deverão ser constituídos posteriormente para esclarecer melhor essa questão, porém, mas ainda assim são demonstrada 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, consequentemente 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 estarem coradas (ROGERO et al. 2003).

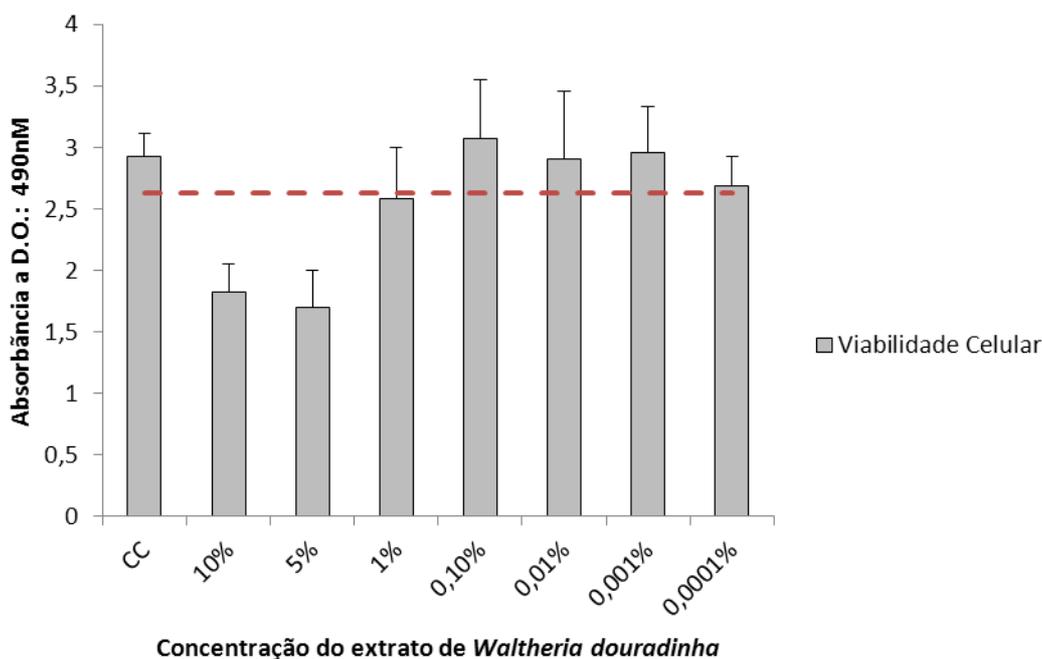


Figura 1 - Leitura de viabilidade células através da incorporação de corante vermelho neutro por células MDBK expostas a diferentes concentrações do extrato aquoso de *Waltheria douradinha*. As barras representam as médias dos valores de absorbância para cada concentração de extrato usada. Os bigodes 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.

Efeito anti-inflamatório agudo

Neste experimento foi possível observar que os grupos de pavilhão auricular tratados com *Waltheria douradinha* 25% (Ext25) e 100% (Ext100) apresentaram uma maior espessura da pinna auricular na medição por paquímetro digital, sendo a concentração de Ext50% equivalente ao grupo controle betametasona, onde não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de tratamento. O edema observado durante o processo inflamatório caracteriza a vasodilatação e extravasamento de líquido intersticial, além de células (principalmente leucócitos polimorfonucleados) para o combate aos agentes causadores do processo inflamatório (CORUZZI et al. 2011, LOGESWARI et al. 2014, OLIVEIRA et al. 2014).

Na busca por novos fármacos muitos esforços devem ser direcionados para o modelo animal e tipo de ensaio adequado. Diversos estudos utilizando o modelo de indução de inflamação no conduto auditivo de roedores demonstraram que a inflamação induzida pelo óleo de cróton 5% em acetona é fidedigna e procede com as mesmas características da inflamação natural ocorrida em outros tecidos, sendo um padrão e parâmetro para avaliação de compostos com potencial efeito anti-inflamatório (TUBARO et al. 1985, BRALLEY et al. 2008, CORUZZI et al. 2011, LOGESWARI et al. 2014, MARILENA et al. 2015). Após a eutanásia dos roedores foi possível observar que as orelhas onde houve a instilação do óleo de cróton associado a acetona demonstraram maior atividade irritativa através da visualização de eritema e edema macroscopicamente, tal fato não foi observado nas orelhas que receberam apenas

o veículo. Coruzzi et al. (2011), também destacam o potencial irritante do óleo de cróton, onde o aumento do peso das orelhas se torna evidente quando comparados com as que apenas recebem acetona. Seguindo este critério para avaliação de redução de edema encontramos o grupo controle positivo (betametasona) reduzindo a inflamação com maior eficiência (-22.21), seguida pelos grupos WD50 (-8.27), WD100 (-5.44), CN (-1.53) e WD25 (7.19). Esta fórmula matemática é descrita como método comparativo entre os ouvidos instilados com cróton 5% diluído em acetona e acetona 100%. Esta avaliação nos demonstra o potencial irritante da acetona, mas também o potencial irritante ou redutor de inflamação dos tratamentos instilados. O óleo de cróton contém um éster de forbol (12-o-tetradecanoilforor-13-acetato) que quando em contato com a pele gera uma ação irritante, aumentando a permeabilidade vascular e induzindo a síntese de metabólitos do ácido araquidônico, a expressão da cicloxigenase-2, interleucina-1 β , do fator de necrose tumoral alfa, entre outros; todos associados com o processo inflamatório agudo (MARILENA et al. 2015).

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 ciclooxigenase, 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 ciclooxigenase (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 de doenças vasculares, doenças neurológicas e até mesmo a incidência que alguns tipos de câncer. 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.

Em nosso estudo também foi observado que os grupos Ext25 e Ext100, demonstraram maior potencial edematogênico nas orelhas tratadas, tal fato é atribuído ao potencial efeito indutor pró-inflamatório dos fitoterápicos.

Ainda, a inexistência de resultados com significância estatística se deve ao fato de o organismo do indivíduo também estar respondendo através do processo inflamatório quando em contato com a substância instilada, ou seja, mimetizamos e potencializamos o que seria natural para um indivíduo sadio quando administramos o extrato aquoso de *W. douradinha*. Como descrito anteriormente, o processo inflamatório não lesivo tende a diminuir o período de duração da reação, desta maneira ocasionando menos danos as células hígdas daquele tecido.

Assim como descrito anteriormente para o edema do pavilhão auricular, o peso das pinnas tratadas com o extrato aquoso de *W. douradinha* foi maior em todos os grupos tratados quando comparados aos grupos controle, sendo o grupo Ext25 o de maior média, porém sem apresentar significância estatística comparado aos demais grupos (Figura 2). Porém, os dados demonstram, mesmo que de forma diminuta, que o extrato aquoso de *W. douradinha* pode futuramente exercer sua potencialidade como pró-inflamatório, devendo ser mais pesquisado. Conforme observado por Coruzzi et al. (2011), a administração de apenas uma dose do extrato, por eles denominado de JNJ7777120, se demonstrou ineficaz, contudo, quando administrado por uma segunda vez o potencial anti-inflamatório do extrato se tornou evidente, sendo tão efetivo quanto o medicamento alopático utilizado no experimento, porém o efeito desejado pelo estudo, relacionado a diminuição do prurido ocasionado por mediadores histamínicos, não foi alcançado.

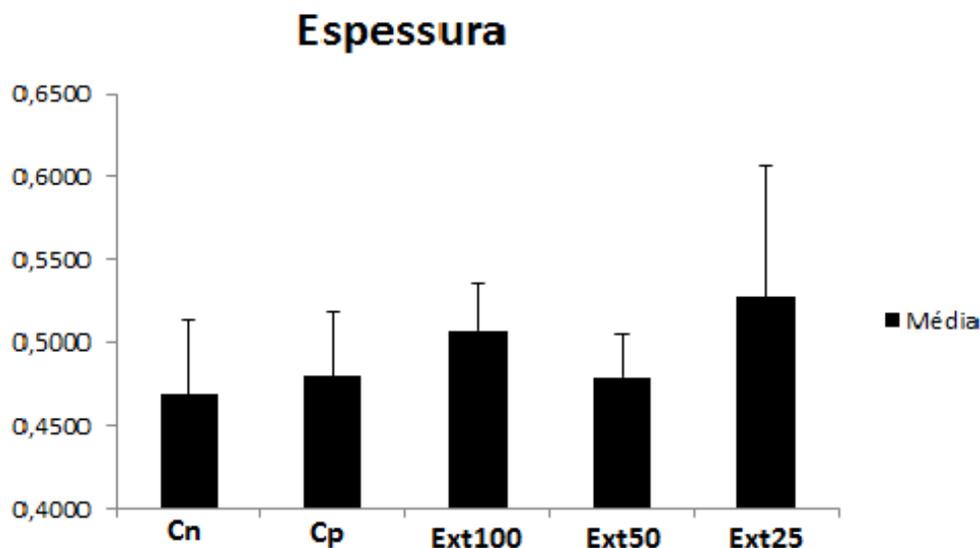


Figura 2 - Espessura do pavilhão auricular de roedores induzidos a inflamação com óleo de cróton em 5% de acetona e tratados com solução fisiológica (Cn), *Waltheria douradinha* 100% (Ext100); *W. douradinha* 50% (Ext50); *W. douradinha* 25% (Ext25) e betametazona (Cp).

Também, Oliveira et al. (2014) descreveram a ação analgésica do extrato de *Scutellaria agrestis*, porém sem efeito na ação antiedematogênica. A administração do extrato se deu por via subcutânea em roedores, sendo que o uso popular descreve a planta como um dos possíveis tratamentos tópicos para otite externa em

humanos. Isto nos demonstra que por diversas vezes os métodos de pesquisa, assim como o uso popular podem mascarar resultados significantes.

O possível efeito pró-inflamatório indicado em nosso estudo pela observação edematogênica da administração do extrato aquoso, assim como pela

observação dos flavonoides presentes na amostra química, é positivo, visto que a liberação de mediadores químicos que irá favorecer o reconhecimento do organismo contra antígenos exógenos. Nessa situação temos liberação de diversas moléculas por células responsáveis pela proteção do nosso organismo, como também por células lesadas. Tal fato irá atuar de forma a ativar defesas celulares, fazer quimiotaxia, promover a vasodilatação, e pôr fim debelar o antígeno local (BALBINO 2011, PELUSO et al. 2013).

Em tempo, pesquisas adicionais também são necessárias para que se possa determinar a permeabilidade, absorção e demais formas de uso dermatológicas do extrato aquoso de *W. douradinha*. Estudos posteriores utilizando cultivo celular de fibroblastos devem ser preconizados, visto que esses estão diretamente relacionados ao reparo tecidual agudo (MARTINEZ et al. 2009). Ainda, ressaltamos que os estudos *in vitro* norteiam o uso dos fitoterápicos com uma potencial atividade, contudo, não eliminam a necessidade de estudos *in vivo*, onde estão envolvidos outros fatores.

CONCLUSÃO

A Nas condições aqui descritas, o extrato aquoso de *Waltheria douradinha* demonstrou possuir atividade citotóxica nas concentrações de 1, 5 e 10% para linhagens celulares de MDBK e VERO, além de efeito edematogênico auricular quando administrado na orelha externa de ratos induzidos a otite com óleo de cróton.

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, UFPel, 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. doi: 10.1590/1413-81232017225.16722015.
- CAPELLA, S.O., TILLMANN, M.T., FÉLIX, A.O.C., FONTOURA, E.G., FERNANDES, C.G., FREITAG, R.A., SANTOS, M.A.Z., FÉLIX, S.R., NOBRE, M.O. Potencial cicatricial de *Bixa Orellana* L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.1 n°68, p.104-112, 2016.
- CORUZZI, G. et al. Strain-dependent effects of the histamine H4 receptor antagonist JNJ7777120 in a murine model of acute skin inflammation. **Experimental Dermatolog**, v.21, p.32-37, 2015. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01396.x
- 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.
- HASENCLEVER, L. et al. The Brazilian phytotherapies industry: challenges and opportunities. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, n.8, p.2559-2569, 2017. doi: 10.1590/1413-81232017228.29422016
- LOGESWARI, P. et al. *In vivo* antiinflammatory 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.
- 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.
- MARILENA, A.R. et al. Topical Anti-Inflammatory Effects of Isorhamnetin Glycosides Isolated from *Opuntia ficus-indica*. **Biomedical Research International**, 2015. doi.org/10.1155/2015/847320
- 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.
- OLIVEIRA, A.B. et al. 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 Medicinais**, v.16, n.2, p.174-181, 2014.
- PELUSO, I. et al. Flavonoids and immune function in human: A systematic review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.55, n.3, p.383-395. 2013. doi.org/10.1080/10408398.2012.656770
- PÉREZ-CANO, F.J.; CASTELL, M. Flavonoids, inflammatory and immune system. **Nutrients**, v.8, p.659; 2016. doi:10.3390/nu8100659
- RICARDO, M.A. et al. Topical Anti-Inflammatory Effects of Isorhamnetin Glycosides Isolated from *Opuntia ficus-indica*. **BioMed Research International**, 2015.
- ROGERO, S.O. et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: 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. doi:10.3390/molecules19021459

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.

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. DOI: 10.1017/S002966510000162X

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.

TUBARO, A. et al. The croton oil era test revisited. *Agents and Actions*, v.17, n.3/4, 1985.

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