



**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR**

ROGÉRIO DE AQUINO SARAIVA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO FIXO DO
MESOCARPO INTERNO DE *Caryocar coriaceum*
WITTM. SOBRE O EDEMA INDUZIDO POR AGENTES
FLOGÍSTICOS EM MODELOS ANIMAIS**

CRATO,
2009.

ROGÉRIO DE AQUINO SARAIVA

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO FIXO DO MESOCARPO INTERNO DE *Caryocar coriaceum* WITTM. SOBRE O EDEMA INDUZIDO POR AGENTES FLOGÍSTICOS EM MODELOS ANIMAIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como requisito parcial para obtenção de título de mestre em Bioprospecção Molecular (Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais).

Orientador:

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Co-orientadora:

Prof.^a Dr.^a Adriana Rolim Campos Barros

CRATO,

2009

Saraiva, Rogério de Aquino.

S243e Efeito anti-inflamatório do óleo fixo de mesocarpo interno de *Caryocar coriaceum* Wittm. em edemas induzidos por agentes flogísticos em modelos animais/ Rogério de Aquino Saraiva. – Crato-CE, 2009. 115p.; il.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Mestrado em Bioprospeção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Rolim Campos Barros

1. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) – Produtos Naturais.
2. Óleo de Pequi 3. Agentes irritantes. 4. Atividade anti-inflamatória tópica. 5. Ácidos Graxos: atividade biológica. I. Título.

CDD: 615.323

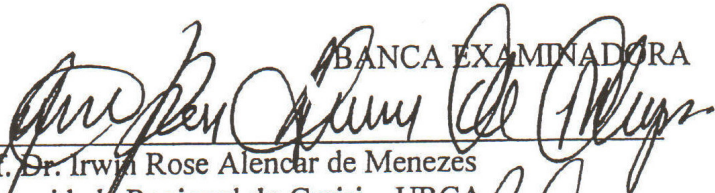
ROGÉRIO DE AQUINO SARAÍVA

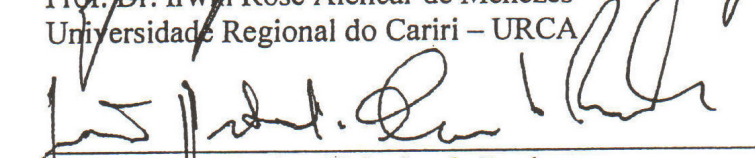
EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO FIXO DO MESOCARPO INTERNO DE *Caryocar coriaceum* Wittm. SOBRE O EDEMA INDUZIDO POR AGENTES FLOGÍSTICOS EM MODELOS ANIMAIS.

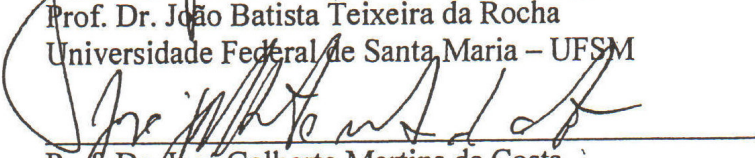
Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de Concentração: Bioprospecção Molecular. Linha de Pesquisa: Bioprospecção de Produtos Naturais.

Aprovada em 04/09/2009

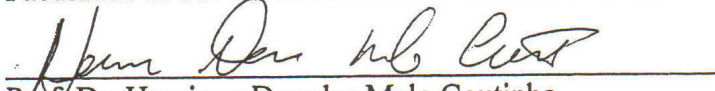
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes
Universidade Regional do Cariri – URCA


Prof. Dr. João Batista Teixeira da Rocha
Universidade Federal de Santa Maria – UFSM


Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa
Universidade Regional do Cariri – URCA


Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerfa Felipe
Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ


Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho
Universidade Regional do Cariri – URCA

DEDICO este trabalho aos meus pais Geraldo e Maria das Graças, pelo amor, investimento, educação e incentivo. Às minhas irmãs, Regiane e Rayane, pelo carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho é resultado da somatória de muitas forças humanas, sem as quais ele teria sido impossibilitado de acontecer.

Primeiramente agradeço a Deus, criador do Universo e de todas as formas de matéria e energia, por ter propiciado a existência da vida e de tantos mistérios que instigam o ser humano na busca de sua compreensão;

Aos meus pais Geraldo e Graça, que, com amor, lutaram e dedicaram suas vidas pela minha formação humana e sucesso profissional e às minhas irmãs Regiane e Rayane, pelo companheirismo, apoio e incentivo;

Ao meu orientador Prof. Dr. Irwin Alencar de Menezes, por ter se disponibilizado em me orientar neste estudo, por todo o aprendizado adquirido e pelo incentivo à pesquisa;

À professora Dr^a Adriana Rolim Campos, pelo auxílio e colaboração fundamentais para o grande sucesso deste trabalho;

Aos professores Dr^a Marta Kerntopf e Dr. Iri Sandro Lima, pelo apoio e pelas sugestões valiosas na banca de qualificação;

Aos colegas do grupo de pesquisa em Farmacologia e Química Molecular: Alaiane Abreu, Andreza Guedes, Gerlânia Leite, Heloísa Souza, Kleber Dackson, Laura Hévila, Mariana Andrade, Norma Fernandes, Paula Denise, Renata Sampaio e Romagna Castro, pela disponibilidade nos testes e pela amizade firmada;

Ao prof. Dr. Galberto Martins e Msc. Fabíola Galvão, pelo apoio à obtenção do óleo de pequi, os ensaios fitoquímicos e a contribuição de reagentes.

Ao prof. Dr. Henrique Douglas Coutinho, pelos ensaios de fototoxicidade em micro-organismos;

À prof^a Dr^a Adriana Tomé, pela concessão das análises histopatológicas;

À prof^a Lígia de Queiroz Matias e ao Herbário Prisco Bezerra (UFC), pela identificação e depósito da exsicata do pequizeiro.

À minha grande amiga Sarahbelle Cartaxo, por todo apoio motivacional nos momentos decisivos;

Aos colegas de mestrado: Carla Karine, Carlos Vidal, Dayanne Rakelly, Elizângela Bento, Elizaudo Brito, Erlânio Souza, Felipe Silva, Francisco Cunha, Glauberto Quirino, Idila Maria, Nara Kelly, Paulo Alvacely, Samuel Vieira e Tarciana Guedes, pelo companheirismo dispensado;

Ao biólogo e prof. Msc. Lécio Almeida, meu orientador da graduação, pelo aprendizado, formação acadêmica e grande incentivo à pesquisa.

À Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e Faculdade de Ciências Aplicadas Leão Sampaio, pela concessão de linhagens de roedores para os ensaios *in vivo*;

À FUNCAP, pela concessão da bolsa de mestrado e financiamento de material e ao CNPq, pela concessão de financiamento de material e bolsas dos alunos de iniciação científica envolvidos neste projeto.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a concretização desse estudo, meus sinceros agradecimentos.

*“As pessoas que vencem neste mundo são as
que procuram as circunstâncias de que
precisam e, quando não as encontram, as
criam”.*

Bernard Shaw

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
RESUMO	xvii
ABSTRACT	xviii
RESÚMEN	xix
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Bioprospecção molecular e desenvolvimento de novos fármacos	21
1.2 Inflamação	23
<i>1.2.1 Eventos na inflamação aguda local</i>	25
1.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória de produtos naturais por modelos animais	29
1.4 Óleos fixos	30
<i>1.4.1 Ácidos graxos</i>	31
<i>1.4.2 Ações biológicas de óleos fixos</i>	32
1.5 Pequi do Nordeste (<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm): um fruto da Chapada do Araripe com importância econômica	33
<i>1.5.1 Aspectos botânicos, etnobotânicos e etnofarmacológicos de Caryocar coriaceum</i>	34
<i>1.5.2 Estudos fitoquímicos do gênero Caryocar</i>	39
<i>1.5.3 Atividades biológicas de produtos naturais do gênero Caryocar</i>	40
2 OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	45

3.1 Aspectos éticos da pesquisa	45
3.2 Materiais utilizados	45
3.2.1 <i>Drogas, reagentes e soluções</i>	45
3.2.2 <i>Material permanente e equipamentos utilizados</i>	46
3.2.3 <i>Material botânico</i>	47
3.2.4 <i>Animais</i>	48
3.2.5 <i>Micro-organismos para teste de atividade fotossensibilizante</i>	48
3.3 Obtenção do óleo fixo do mesocarpo interno de <i>Caryocar coriaceum</i>	49
3.4 Identificação dos ácidos graxos do OFCC	49
3.5 Atividade fotossensibilizante dos constituintes do OFCC sob luz UVA em cultura de linhagens de micro-organismos	50
3.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do OFCC através de modelos de edema de orelha induzido por agentes irritantes em camundongos <i>Swiss</i>	51
3.6.1 <i>Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton</i>	51
3.6.2 <i>Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton</i>	52
3.6.3 <i>Edema de orelha induzido por ácido araquidônico</i>	52
3.6.4 <i>Edema de orelha induzido por capsaicina</i>	53
3.6.5 <i>Edema de orelha induzido pela injeção subcutânea de histamina</i>	53
3.6.6 <i>Edema de orelha induzido por fenol</i>	54
3.6.7 <i>Quantificação do edema e do efeito inibitório médio</i>	54
3.6.8 <i>Análise histopatológica</i>	55
3.7 Avaliação do efeito anti-inflamatório do OFCC com tratamento por via oral: edema de pata induzido por carragenina em ratos <i>Wistar</i>	56
3.8 Análise estatística dos dados	56
4 RESULTADOS	58
4.1 Ácidos graxos presentes no OFCC	58

4.2 Efeito fotossensibilizante / fototóxico do OFCC sob luz UVA em cultura de linhagens de micro-organismos	59
4.3 Efeito do tratamento tópico do OFCC nos modelos de inflamação cutânea	60
4.3.1 <i>Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton</i>	60
4.3.2 <i>Associação do OFCC com indometacina no edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton</i>	64
4.3.3 <i>Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton</i>	65
4.3.4 <i>Edema de orelha induzido por ácido araquidônico</i>	68
4.3.5 <i>Edema de orelha induzido por capsaicina</i>	71
4.3.6 <i>Edema de orelha induzido por histamina</i>	72
4.3.7 <i>Edema de orelha induzido por fenol</i>	73
4.4 Efeito do OFCC no edema de pata induzido por carragenina – tratamento agudo por via oral	74
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	91
APÊNDICES	106

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

% por cento; percentual

+ mais

– menos

× vezes, multiplicado por

± mais ou menos

> maior que, superior a

= igual a

< menor que, inferior a

Ø diâmetro

α – alfa

β – beta

γ – gama

Δ, δ – delta

κ – capa

λ – comprimento de onda (lambda)

μL – microlitro(s)

μm – micrômetro(s)

ω – ômega

Å - angström

AA – ácido araquidônico

AL – ácido linoleico

AO – ácido oleico

AP – ácido palmítico

AINE's – anti-inflamatórios não esteroides

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de variância, inglês)

BK1 – receptor de bradicinina-1

°C – graus Celsius

C. coriaceum – *Caryocar coriaceum* Wittm. (pequizeiro)

C3a , C3b e C5a – proteínas do sistema complemento

Ca²⁺ - cátion cálcio bivalente

CAA – célula apresentadora de antígeno

CAM – molécula de adesão celular (do inglês *cell adhesion molecules*):

CAP – capsaicina

CE – Estado do Ceará (Brasil)

CGRP – peptídeo relacionado ao gene da calcitonina

CLAE-EM – cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas

COX – cicloxigenase

COX-1 – cicloxigenase-1

COX-2 – cicloxigenase-2

E.P.M. – erro padrão da média.

DEX – dexametasona

DHA – ácido docosahexaenoico

DMSO – dimetilsulfóxido

EIM – efeito inibitório médio da inflamação

EPA – ácido eicosapentaenoico

et al. – e outros; e colaboradores (latim, abrev. de *et alii*)

FLONA – Floresta Nacional do Araripe (Chapada do Araripe – Ceará)

g – grama(s)

h – hora(s)

H₂O – água

13-HODE – 13-hidroxi-octadecaenoico

IL-1 – interleucina-1

IL-1 α – interleucina-1-alfa

IL-6 – interleucina-6

IL-8 – interleucina-8

IND – indometacina

i.p. – via intraperitoneal

kg – quilograma(s)

liso-PAF - lisogliceril-fosforilcolina

LOX – lipoxigenase

5-LOX – 5-lipoxigenase

12-LOX – 12-lipoxigenase

15-LOX – 15-lipoxigenase

LFQM – Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (URCA)

LPPN – Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (URCA)
LTB₄ – leucotrieno B₄
LTC₄ – leucotrieno C₄
LTD₄ – leucotrieno D₄
m – metro(s)
m² – metros quadrados
m_{od} – massa do disco retirado da orelha direita
m_{oe} – massa do disco retirado da orelha esquerda
MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
mg – miligrama(s)
mg/kg – miligramas de concentração da solução por quilograma de massa corpórea do animal
mg/mL – miligramas de soluto por mililitro de solvente (água destilada ou salina)
min – minuto(s)
mL – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
8-MOP – 8-metoxipsoraleína
MPE_{cont} – média do percentual de edema do grupo controle negativo
MPE_{trat} – média do percentual de edema do grupo tratado com OFCC ou fármaco padrão
n – número da amostra
n-3 – ômega 3
n-6 – ômega 6
NaCl – cloreto de sódio
NF- κB – *Nucleus factor – kappa B* (Fator de transcrição nuclear – capa B)
NO – óxido nítrico
NOR – norfloxacin
nm – nanômetro(s)
OC – óleo de croton
OFCC – óleo fixo do mesocarpo interno de *Caryocar coriaceum* Wittm.
P – significância estatística (erro)
PAF – fator de ativação plaquetária
PE – percentual de edema
PGD₂ – prostaglandina D₂

PGE₁ – prostaglandina E₁
PGE₂ – prostaglandina E₂
PKC – proteína quinase C
PLA₂ – fosfolipase A₂
PMN – polimorfonucleares (neutrófilos)
® - marca registrada
ROS – *reactive oxygen species* (espécie reativa de oxigênio, inglês)
S – *South* (sul)
TLR – *Toll-like receptors* (Receptores semelhantes ao Toll, inglês)
TPA – 12-*o*-tetracanoilforbol-13-acetato
TXA₂ – tromboxano A₂
TNF- α – *tumor necrosis factor – alpha* (fator de necrose tumoral-alfa, inglês)
UECE – Universidade Estadual do Ceará
UFC – Universidade Federal do Ceará
UFPB – Universidade Federal da Paraíba
URCA – Universidade Regional do Cariri
UV – ultravioleta
UVA – ultravioleta-A
v.o. – via oral
V_e – volume do edema de pata
V_f – volume final da pata
V_i – volume inicial da pata
W – watt
W – *West* (Oeste)
Wittm. – Wittmack

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Visão geral das células e mediadores envolvidos na resposta inflamatória aguda local	26
FIGURA 2. Vias inflamatórias dependentes e independentes do ácido araquidônico (AA)	28
FIGURA 3. Estruturas de ácidos graxos	32
FIGURA 4. Chapada do Araripe.....	34
FIGURA 5. Árvore de <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm (pequizeiro)	37
FIGURA 6. Aspecto das folhas, frutos e flor de <i>C. coriaceum</i> Wittm.	38
FIGURA 7. Exsicata de pequizeiro (<i>C. coriaceum</i> Wittm).	48
FIGURA 8. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton (OC) em camundongos Swiss	61
FIGURA 9. Fotomicrografia de cortes transversais de orelhas de camundongos sensibilizadas com aplicação aguda de óleo de croton (6 h), coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz (aumento de 200 x)	63
FIGURA 10. Potencialização do OFCC no efeito tópico da indometacina sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton (OC) em camundongos Swiss	64

FIGURA 11. Curva tempo-resposta do efeito do OFCC sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de OC em camundongos Swiss	66
FIGURA 12. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de OC em camundongos Swiss.....	67
FIGURA 13. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) em camundongos Swiss.....	68
FIGURA 14. Fotomicrografia de cortes transversais de orelhas de camundongos sensibilizadas com aplicação de AA (1 h), coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz (aumento de 200 x).....	70
FIGURA 15. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido por capsaicina (CAP) em camundongos Swiss.....	71
FIGURA 16. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido por histamina em camundongos Swiss	72
FIGURA 17. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido por fenol em camundongos Swiss	73
FIGURA 18. Curva tempo-resposta do efeito do OFCC (tratamento por via oral) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar	74

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Substâncias utilizadas nos ensaios biológicos45

TABELA 2. Ácidos graxos saponificáveis detectados no OFCC através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)58

TABELA 3. Atividade fototóxica do OFCC em ensaios fotomicrobiológicos com cepas de *E. coli* e *S. aureus*59

RESUMO

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO ÓLEO FIXO DO MESOCARPO INTERNO DE *Caryocar coriaceum* WITTM. SOBRE O EDEMA INDUZIDO POR AGENTES FLOGÍSTICOS EM MODELOS ANIMAIS.

Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae), popularmente conhecido como pequi do Nordeste, é uma planta comumente encontrada em áreas de cerrado da Chapada do Araripe (Ceará, Nordeste do Brasil), cujo fruto é muito utilizado na culinária regional. Desde tempos remotos, a medicina popular local tem utilizado o óleo do mesocarpo interno (polpa do fruto) do pequi no tratamento de inflamações cutâneas, problemas respiratórios, cicatrizações, reumatismo, dores musculares e contusões. Diante disso, este estudo objetivou avaliar o efeito tópico e sistêmico do óleo fixo do mesocarpo interno de *C. coriaceum* (OFCC), através de modelos animais de edema de orelha induzido por diferentes agentes irritantes (óleo de croton, capsaicina, ácido araquidônico, fenol, histamina) e efeito sistêmico através do edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar. A análise do OFCC por CG/EM revelou a presença dos seguintes ácidos graxos: palmitoleico (0,27%), palmítico (34,18%), linoleico (1,80%), oleico (55,79%), esteárico (1,73%), heptadecenoico (5,86%) e 11-eicosenoico (0,37%). O OFCC bruto (20 µL/orelha) demonstrou efeito antiedematogênico significativo ($P < 0,05$) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton (efeito inibitório médio de 32,0%), aplicação múltipla de óleo de croton (a partir de 48 h até 96 h após o primeiro tratamento tópico, com efeito inibitório médio de 41,4% após 96 h da primeira aplicação de OFCC), ácido araquidônico (efeito inibitório médio de 49,7%) e fenol (efeito inibitório médio de 38,8%), enquanto que o tratamento tópico do OFCC não demonstrou redução significativa no edema de orelha induzido por capsaicina e histamina ($P > 0,05$). Os dados apresentados e a análise histológica sugerem que os constituintes do OFCC, quando aplicados topicamente, provavelmente influenciam na diminuição de eicosanoides inflamatórios, seja por inibição das enzimas COX ou LOX ou por síntese de eicosanoides anti-inflamatórios, contribuindo para uma diminuição do influxo de células inflamatórias e outros efeitos edematogênicos, como também provavelmente diminuiu ROS (devido à sua atividade antioxidante), outros mediadores da inflamação importantes. De acordo com o ensaio de atividade fotossensibilizante do OFCC sobre linhagens de micro-organismos expostos a luz ultravioleta A, ficou claro que o OFCC não demonstrou atividade fototóxica contra cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* na presença ou ausência de UVA, indicando sua segurança em aplicações tópicas. Por outro lado, o tratamento por via oral do OFCC em Tween 80 2% nas concentrações 200 e 400 mg/kg não demonstrou inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina, concluindo que o OFCC não demonstra efeito anti-inflamatório sistêmico nas concentrações testadas.

Palavras-chave: óleo de pequi, produtos naturais, atividade anti-inflamatória, ácidos graxos.

ABSTRACT

ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF *Caryocar coriaceum* WITTM. INTERNAL MESOCARP FIXED OIL ON PHLOGISTIC AGENTS-INDUCED EDEMA IN ANIMAL MODELS.

Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae), popularly known as *pequi do Nordeste* (in Portuguese), is a plant commonly found in *cerrado* areas from Araripe plateau (Ceará State, Northeastern Brazil) whose fruit is very appreciated in the local cuisine. Since early times, local folk medicine have applied the use of *C. coriaceum* fruit pulp oil in the treatment of skin inflammation, respiratory affections, wound healing, rheumatism, muscle pain and hurts. This research aimed to evaluate the topical and systemic anti-inflammatory effect of *C. coriaceum* internal mesocarp (fruit pulp) fixed oil (CCFO), using mouse models of ear edema induced by different irritant agents (croton oil, capsaicin, arachidonic acid, phenol, histamine) and carrageenan-induced paw oedema in Wistar rats. GC/MS analysis revealed the presence of following fatty acids: palmitoleic acid (0.27%), palmitic acid (34.18%), linoleic acid (1,80%), oleic acid (55.79%), stearic acid (1.73%), heptadecenoic acid (5.86%) and 11-eicosenoic acid (0.37%). Crude CCFO (20 μ L/ear) demonstrated significant ($P < 0.05$) topical antioedematous effect on ear oedema induced by croton-oil single application (mean inhibition effect of 32.0%), croton oil multiple application (from 48 h to 96 h after the first topical treatment, with final mean inhibition effect of 41.4% after 96 h to first topical CCFO application), arachidonic acid (mean inhibition effect of 49.7%) and phenol (mean inhibition effect of 38.8%), while the topical treatment on capsaicin and histamine-induced ear oedema did not show significant reduction compared to control group ($P > 0.05$). The present data and the histological analysis suggest that the topical application of CCFO have probably influenced on decrease of inflammatory eicosanoids, by COX or LOX inhibition or by synthesis of anti-inflammatory eicosanoid, whose decrease the influx of inflammatory cells and the edematous effect, as well decrease ROS (because of its antioxidant activity), another important inflammation mediators. According to photosensitivity activity *in vitro* bioassay of CCFO on microorganisms exposed to ultraviolet-A light, it was clear that CCFO did not show toxicity against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains in presence or absence of UVA, indicating its safety in topical skin applications. In the other hand, the *per os* treatment of CCFO in Tween 80 2% at 200 and 400 mg/kg did not show significant inhibition on carrageenan-induced paw oedema, concluding that CCFO did not have systemic anti-inflammatory effect at concentrations tested.

Keywords: *Caryocar coriaceum* oil; natural products; anti-inflammatory activity; fatty acids.

RESÚMEN

EFFECTO ANTIINFLAMATORIO DEL ACEITE FIJO DEL MESOCARPIO INTERNO DE *Caryocar coriaceum* WITTM. SOBRE EL EDEMA INDUCIDO POR AGENTES FLOGÍSTICOS EN MODELOS ANIMALES.

Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae), popularmente conocido como *pequi do Nordeste* (en portugués), es una planta común en áreas de *cerrado* de la meseta del Araripe (Provincia de Ceará, nordeste de Brasil), cuyo fruto es muy apreciado en la gastronomía local. Hace mucho tiempo, la medicina popular local ha utilizado el aceite del pulpo de pequi en el tratamiento de la inflamación de la piel, afecciones respiratorias, la cicatrización de heridas, reumatismo, dolor muscular y duele. Con eso, esta investigación tuvo como objetivo evaluar los efectos antiinflamatorios tópicos y sistémicos del aceite fijo obtenido del mesocarpio interno (pulpa del fruto) de *C. coriaceum* (AFCC), utilizando modelos animales de edema de oreja inducido por diferentes agentes irritantes (aceite de crotón, capsaicina, ácido araquidónico, fenol, histamina) y el edema de la pata inducido por carragenina en ratones Wistar. Análisis de GC/MS reveló la presencia de los siguientes ácidos grasos: ácido palmitoleico (0,27%), ácido palmítico (34,18%), ácido linoleico (1,80%), ácido oleico (55,79%), ácido esteárico (1,73%), ácido heptadecenoico (5,86%) y ácido 11-eicosenoico (0,37%). El AFCC bruto (20 µL/oreja) demostró diferencias significativas ($P < 0,05$) en el efecto antiedematogénico del edema de oreja inducido por la aplicación única de aceite de crotón (media del efecto de inhibición de 32,0%), aplicación múltiple de aceite de crotón (de 48 h a 96 h después del primero tratamiento tópico, con media del efecto de inhibición final de 41,4% después de 96 horas a la primera aplicación tópica de AFCC), ácido araquidónico (media del efecto de inhibición de 49,7%) y fenol (media del efecto de inhibición de 38,8%), mientras que el tratamiento tópico del edema de oreja inducido por la capsaicina y histamina no mostraron reducción significativa en comparación con el grupo control ($P > 0,05$). Los datos presentados y el análisis histológico indican que la aplicación tópica de AFCC probablemente han influido en la disminución de eicosanoides inflamatorios, por inhibición de la COX o LOX o mismo en la síntesis de eicosanoides antiinflamatorios, que contribuyen para la disminución de la afluencia de células inflamatorias y otros efectos edematosos, como también la probable disminución de ROS (debido a su actividad antioxidante), otros importantes mediadores de la inflamación. De acuerdo con el teste *in vitro* de actividad fotosensible del AFCC sobre microorganismos expuestos a los rayos ultravioleta-A, es evidente que el AFCC no mostró fototoxicidad contra cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en presencia o ausencia de los rayos UVA, con indicación de su seguridad en las aplicaciones tópicas de piel. En el otro lado, por el tratamiento oral de AFCC diluido en Tween 80 al 2% en las concentraciones 200 y 400 mg/kg no mostró una inhibición significativa en el edema de pata inducido por carragenina, concluyendo no tener efecto antiinflamatorio sistémico significativo en las concentraciones probadas.

Palabras clave: aceite de pequi; productos naturales, actividad anti-inflamatoria; ácidos grasos.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Bioprospecção molecular e desenvolvimento de novos fármacos

Desde os tempos mais remotos, o ser humano busca na natureza recursos para o desenvolvimento de tecnologias necessárias com fins a aumentar suas chances de sobrevivência. Tal ação resultou em melhorias na sua qualidade e expectativa de vida ao longo da história (LORENZI & MATOS, 2002; GURIB-FAKIM, 2006). Considerando-se este fato, é atribuída aos elementos da biodiversidade uma grande relevância, por propiciar forte estratégia para a segurança alimentar, econômica e ecológica para a humanidade: é dela que dependerá a sobrevivência das gerações futuras e os interesses econômicos das nações. Por isso, há uma grande preocupação quanto à manutenção, avaliação e troca da diversidade genética em âmbito mundial (RIBEIRO & RODRIGUES, 2006; GUERRA & NODARI, 2007).

Uma forma de conhecer e investigar os elementos potenciais da biodiversidade é através da bioprospecção. A bioprospecção é definida como uma pesquisa de material biológico que objetiva a exploração dos seus recursos genéticos, garantindo o uso sustentável, a utilização de estratégias de conservação, a garantia de distribuição justa e igualitária dos benefícios advindos de sua utilização, como também a promoção e regulamentação de novas tecnologias (AZEVEDO, 2003). A partir deste conceito, a bioprospecção molecular, de forma multidisciplinar (envolvendo as ciências biológicas e da saúde), objetiva levantar informações importantes quanto a aplicabilidade de moléculas e substâncias químicas provenientes de material biológico para fins diversos, ao mesmo tempo salientando a importância do seu uso sustentável e de sua conservação para as futuras gerações.

O Brasil, por possuir cerca de 20% do número total de espécies de todo o mundo, é considerado o país de maior biodiversidade do planeta. O número de espécies nativas conhecidas está em torno de 55 mil no total, distribuídas entre os seis maiores biomas ocorrentes: Floresta Amazônica (30 mil), Cerrado (10 mil), Caatinga (4 mil), Mata Atlântica (10 mil), Pantanal (10 mil) e Floresta Subtropical (3

mil) (VIEIRA, 1999). Nesse sentido, nosso país ocupa uma posição privilegiada e importante, já que detém uma matéria-prima considerável para o fornecimento de produtos naturais com fins terapêuticos (sobretudo plantas medicinais), justificando assim a necessidade de se realizar maiores estudos, guardar e proteger amostras significativas dos mais diversos ecossistemas contra os mais diversos desastres ambientais (TAKEDA *et al*, 2001).

Os produtos naturais são definidos como material biológico que fornece substâncias com moléculas bioativas, podendo ser únicas a um organismo ou comuns a um grupo de organismos filogeneticamente relacionados (MANN, 1987). Essas moléculas bioativas são provenientes do metabolismo primário ou secundário e pertencem a classes químicas definidas (SANTOS, 2007).

O uso de produtos naturais, sobretudo das plantas medicinais pelo ser humano é tão remoto quanto a sua própria existência e o conhecimento tradicional é repassado, nas diferentes culturas, através das gerações (PHILLIPSON, 2001). Nos últimos anos, a fitoterapia ganhou destaque como alternativa ao tratamento das mais diversas enfermidades, sobretudo nos países em desenvolvimento, onde existe grande acessibilidade da população às plantas medicinais e os serviços públicos de saúde são limitados (AGRA *et al*, 2007).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonóides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos, lignanas, etc, tem sido objeto de incessantes estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998). Sabe-se que já foram isolados e caracterizados até o momento cerca de 140 mil metabólitos intermediários de aproximadamente 10% da biodiversidade mundial estudada. No entanto, muitos desses compostos ainda não foram avaliados biologicamente (CALIXTO, 2003). É possível que muitas destas substâncias ainda não avaliadas biologicamente possam futuramente ser aproveitadas como agentes medicinais (CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

O isolamento de princípios ativos só ocorreu a partir do século XIX, com o desenvolvimento da química orgânica paralelo ao estudo de plantas com potencialidade terapêutica (PHILLIPSON, 2001). Esses estudos propiciaram o isolamento e a caracterização química de muitos princípios ativos consagrados até hoje pela sua eficácia no tratamento de doenças. Prova disso é a quantidade de

fármacos atualmente utilizados que foram isolados ou sintetizados a partir de plantas medicinais, como, por exemplo, a morfina (analgésico opióide), o taxol (antitumoral), a aspirina (anti-inflamatório e analgésico), a quinina (antimalárico) e a pilocarpina (tratamento de glaucoma) (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

Além da produção de fármacos originados de moléculas bioativas, é importante destacar também a produção de fitoterápicos ou fitomedicamentos. Os fitoterápicos são preparações que apresentam extratos padronizados de uma ou mais plantas que possuem substâncias ativas presentes. Os efeitos farmacológicos de um fitoterápico são atribuídos a um único constituinte químico presente ou a uma interação de vários constituintes químicos do mesmo extrato (WAGNER & WISENAUER, 2006).

Na atualidade, o grande desafio para o aproveitamento racional da biodiversidade brasileira visando a produção de medicamentos é, sem dúvida, como transformar um imenso patrimônio genético natural em riquezas, criando indústrias de base tecnológica e gerando empregos qualificados. No Brasil, apesar das iniciativas de desenvolvimento tecnocientífico em áreas relacionadas ao estudo de novos fármacos (principalmente através de grupos de pesquisa vinculados a programas de pós-graduação, que se destacam pelo número significativo de pesquisas publicadas), é necessário ainda uma ampliação dos núcleos de pesquisa, com maior investimento, incentivos e formação de novos cientistas (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

1.2 Inflamação

A inflamação é um dos processos fisiológicos mais antigos conhecidos pelo ser humano, por apresentar sinais característicos e ser uma das patologias mais frequentes em humanos e outros vertebrados. As primeiras civilizações (Mesopotâmia e Egito, datadas de 3000 a.C.) já descreviam a inflamação a partir da observação de uma lesão na pele avermelhada, quente e dolorosa, comparando-a a algo de sensação ardente, que queima como se estivesse em contato com chamas. A própria palavra inflamação vem do grego *phlegmoné* ou do latim *inflammatio* que significa “algo flamejante, que queima” (RYAN & MAJNO, 1977).

No sentido geral, a inflamação é definida como uma resposta de defesa de um tecido vivo vascularizado a um estímulo nocivo (microorganismos, toxinas, células necróticas, etc.), podendo também estar associado a doenças infecciosas, imunológicas, vasculares ou trauma (LARSEN & HENSON, 1983; COTRAN *et al*, 2000).

No geral, uma resposta imediata da inflamação desencadeia cinco sinais descritíveis, denominados de sinais cardinais da inflamação¹: *dor*, *calor* (aumento da temperatura local), *tumor* (inchaço ou eritema), *rubor* (vermelhidão – aumento do fluxo sanguíneo) e a *perda da função* da região afetada (por afetar as terminações nervosas). Esses sinais são consequências de eventos vasculares (alteração do fluxo e calibre dos vasos, aumento da permeabilidade ou extravasamento vascular) e celulares (adesão celular, quimiotaxia e ativação leucocitária e fagocitose). Esses eventos são desencadeados pela ativação de vários mediadores químicos (histamina, serotonina, proteínas do sistema complemento, do sistema cinina e da coagulação, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, citocinas, óxido nítrico, componentes lisossômicos dos leucócitos, neuropeptídeos e radicais livres derivados do oxigênio, etc.), que mantêm e modulam todo o processo inflamatório (COTRAN *et al.*, 2000).

De acordo com o tempo de duração, a inflamação pode ser denominada aguda (resposta imediata, relativamente curta, de duração entre minutos a alguns dias) ou crônica (de longa duração, com persistência dos eventos inflamatórios, de semanas a meses). Muitas patologias são caracterizadas com inflamação crônica, como a artrite reumatoide, a asma e muitas doenças autoimunes (SILVERTHORN, 2003).

A reação inflamatória aguda apresenta dois componentes: uma resposta inata (ou não-adaptativa), que corresponde a um conjunto de mecanismos de defesa imediata do próprio organismo capaz de reconhecer e destruir o agente agressor; e uma resposta imunológica adaptativa (adquirida ou específica), que é somente desencadeada após um patógeno ter sido reconhecido pelo sistema inato. A resposta adaptativa é constituída por um conjunto de respostas específicas contra o

¹Os quatro primeiros sinais cardinais (dor, calor, rubor e tumor) foram descritos há cerca de 2000 anos pelo romano Cornelius Celsus. Já perda da função (*Functio læsa*) foi complementada por Rudolf Virchow em 1858 no livro *Patologia Celular*, estabelecendo assim as bases patológicas da inflamação (RYAN & MAJNO, 1977).

patógeno e também torna a imunidade inata mais eficiente, graças ao sistema de memória (mediados por linfócitos) (HENSON, 2005).

A etapa final do processo inflamatório visa à reparação da estrutura tecidual lesada, com a regeneração de células parenquimatosas nativas, e/ou a formação de fibroblastos, que vão repor as substâncias intercelulares na região, além de nova vascularização (CORMACK, 1991).

1.2.1 Eventos na inflamação aguda local

Os macrófagos teciduais e as células dendríticas são células apresentadoras de antígenos (CAA) e, numa situação normal, são capazes de reconhecer agentes estranhos ao organismo. No caso de micro-organismos patógenos, o reconhecimento se dá graças aos receptores específicos de membrana conhecidos por Toll ou TLRs (do inglês *Toll like-receptors*, ou receptores semelhantes ao Toll) presentes nas CAA's. Os TLRs interagem com estruturas específicas de membrana altamente conservadas em bactérias, vírus e fungos, denominadas de *padrões moleculares associados ao patógeno* (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Uma vez existindo a interação de um PAMP com os TLRs de macrófagos ou células dendríticas, ocorre uma transdução de sinais que ativa o fator de transcrição nuclear NF- κ B que, ao migrar para o núcleo, ativa a transcrição de vários genes necessários para a liberação imediata de quimiocinas (responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos), citocinas pró-inflamatórias e enzimas ligadas à produção de eicosanoides inflamatórios (HENSON, 2005; KINDT *et al*, 2008).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL)-1 e -6 são exemplos de citocinas liberadas por macrófagos após reconhecimento de agentes agressores. Estas são responsáveis pela indução da coagulação e do aumento da permeabilidade vascular pelo extravasamento de exsudato líquido. Esse exsudato é rico em componentes de quatro cascatas enzimáticas proteolíticas: sistema da coagulação, sistema fibrinolítico, sistema das cininas e sistema do complemento (LAWRENCE *et al.*, 2002).

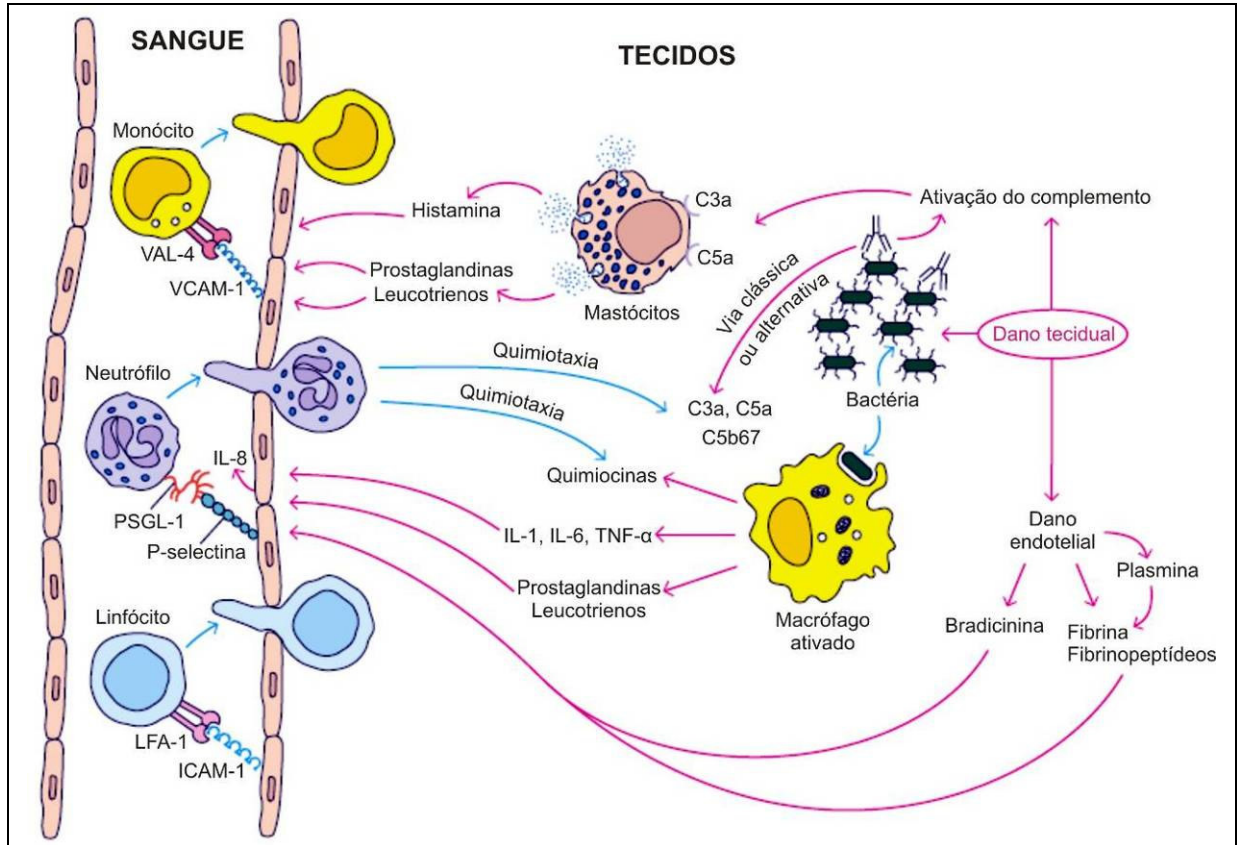


FIGURA 1. Visão geral das células e mediadores envolvidos na resposta inflamatória aguda local. O dano tecidual leva à formação dos produtos complementares que agem como opsoninas, anafilatoxinas e agentes quimiotáticos. A bradicinina e os fibrinopeptídeos induzidos pelo dano endotelial medeiam as alterações vasculares. Os neutrófilos são geralmente os primeiros leucócitos a migrarem para o tecido, seguidos pelos monócitos e linfócitos. Apenas algumas das interações envolvidas no extravasamento de leucócitos são retratadas. Fonte: KINDT *et al.*, 2008, p. 351.

Vários produtos finais das cascatas enzimáticas proteolíticas influenciam o processo inflamatório: a bradicinina (produzida na cascata das cininas), é potente vasodilatador, aumenta a permeabilidade vascular, que por compressão de nociceptores, provoca dor, produz eicosanoides e estimula a síntese de óxido nítrico (NO) endotelial (também vasodilatador); produtos dos sistemas fibrinolíticos e da coagulação, juntamente com outros ativadores, induzem a cascata do complemento, liberando peptídeos importantes: C3a e C5a, que ativam os mastócitos para liberar histamina (amina vasoativa responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e tem ação vasodilatadora) e que também funcionam como substâncias quimiotaxoras, recrutando leucócitos para o local do foco inflamatório; e C3b, uma

opsonina que adere à superfície de micro-organismos para facilitar a fagocitose pelos leucócitos. O peptídeo C5a também age como uma quimiotaxina, recrutando leucócitos para o local do foco inflamatório (KINDT *et al.*, 2008).

Além de induzir aumento de permeabilidade vascular, o TNF- α e a IL-1 também atuam nas células endoteliais de vênulas pós-capilares, provocando a expressão de moléculas de adesão celular (CAMs, do inglês *cell adhesion molecules*): selectinas e integrinas, objetivando a migração de neutrófilos para o local inflamado, por diapedese (ROITH *et al.*, 2003).

Os eicosanoides, diferentemente de aminas vasoativas (como a histamina), não são encontrados pré-formados nas células, mas são produzidos a partir de precursores fosfolipídicos quando há necessidade. Eles estão envolvidos em vários processos homeostáticos no organismo e são os moduladores e mediadores mais importantes da resposta inflamatória (RANG *et al.*, 2007). O substrato essencial para a produção dos eicosanoides é o ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poli-insaturado 20:4 (com ligações duplas nos carbonos 5, 8, 11 e 14 da cadeia). Inicialmente, o AA encontra-se esterificado nos fosfolipídios de membrana da maioria das células (sua concentração livre é pequena). Quando ocorre lesão celular ou liberação de estímulos de um processo inflamatório (transdução de sinais, trombina, C5a, bradicinina, reações antígeno-anticorpo), a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) citosólica é ativada, liberando duas substâncias importantes para o processo inflamatório: a lisogliceril-fosforilcolina (liso-PAF), o precursor do fator de ativação plaquetária (PAF) e o AA. O PAF é outro importante mediador inflamatório: é uma quimiotaxina que além de possuir uma ação vasodilatadora, age aumentando a permeabilidade vascular e também apresenta ação broncoconstritora (MORROW & ROBERTS-II, 2003).

O AA liberado é o precursor de vários eicosanoides pró-inflamatórios, como as prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGI₂ (vasodilatadoras, hiperalgésicas, pirogênicas, inibem a ação plaquetária) e os leucotrienos LTB₄ (quimiotaxina), LTC₄, LTD₄ e LTE₄ (aumentam a permeabilidade vascular) (LAWRENCE *et al.*, 2002). A síntese de prostaglandinas e tromboxanos é promovida pelas enzimas cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) e a síntese de leucotrienos é desencadeada pela 5-lipoxigenase (5-LOX) (MORROW & ROBERTS-II, 2003).

Tendo em vista a influência dos eicosanoides e de outros mediadores não-derivados do AA no processo inflamatório, pode-se resumidamente classificar as

vias inflamatórias como dependentes do ácido araquidônico ou independentes do ácido araquidônico (YOON & BAEK, 2005; ISSA et al., 2006). Enzimas envolvidas na produção dos eicosanoides inflamatórios, como a COX, LOX e PLA₂, fazem parte da via inflamatória dependente de AA. Já estruturas moleculares como, por exemplo, o fator de transcrição NF-κB (que ativa genes responsáveis pela expressão de quimiocinas, e citocinas e é ativado por vários outros fatores, como os receptores TLR ou a presença de espécies reativas de oxigênio – ROS), a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) que libera NO, são consideradas integrantes da via inflamatória independente de AA (ISSA et al., 2006).

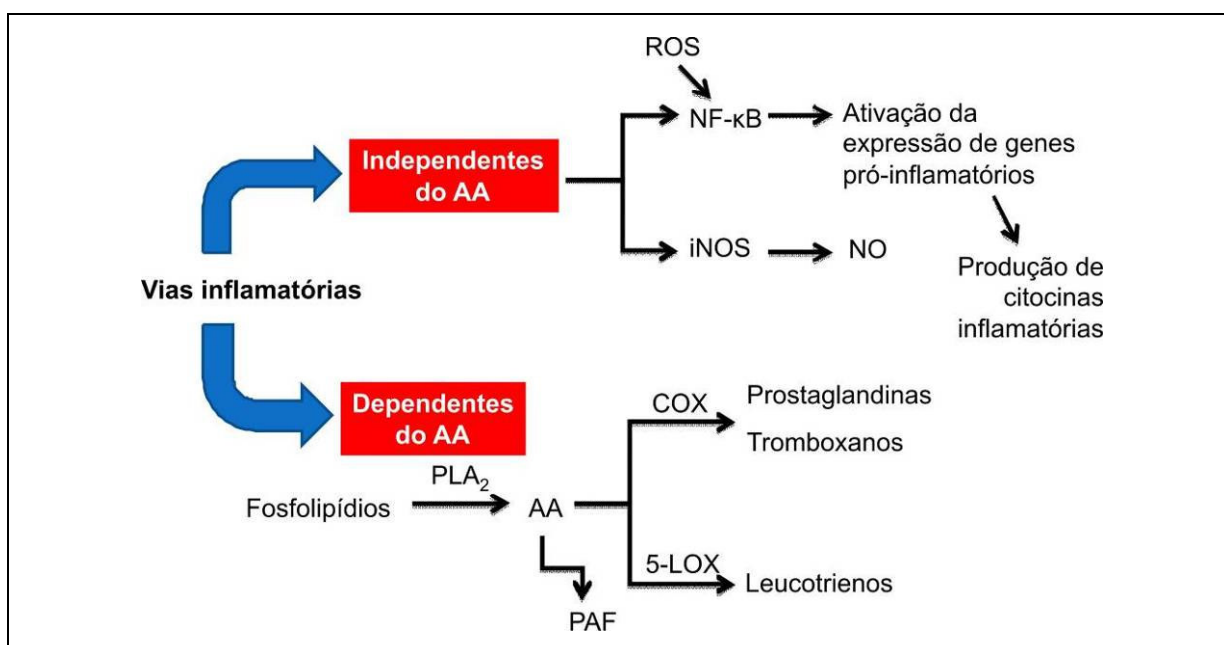


FIGURA 2. Vias inflamatórias dependentes e independentes do ácido araquidônico (AA). Na via inflamatória dependente do AA, uma variedade de agentes provocam a liberação de AA da membrana celular (fosfolipídios) pela ação da PLA₂. A ação subsequente da COX-1, COX-2 e 5-LOX inicia a conversão de AA em uma variedade de mediadores inflamatórios e muitos outros processos. Na via inflamatória independente de AA, outras estruturas moleculares expressam mediadores inflamatórios importantes no processo (por exemplo, o NF-κB e o iNOS). Adaptado de: ISSA et al., 2006.

De uma forma geral, a inflamação é um importante conjunto de respostas de proteção a um agente estranho invasor ao organismo e fundamental para o combate de infecções, cicatrização de feridas e o reparo tecidual de órgãos afetados. Por

outro lado, a inflamação e a reparação tecidual podem ser potencialmente nocivas, gerando dor, fibrose, reações de hipersensibilidade, entre outros fatores, trazendo sofrimento ao paciente (COTRAN *et al.*, 1996). Diante disso, busca-se o desenvolvimento de fármacos que minimizem os efeitos negativos da inflamação, contribuindo para um tratamento com menos sofrimento. Dentre os fármacos mais frequentemente empregados para este fim, citam-se os anti-inflamatórios esteroides ou corticoesteroides (inibem a atividade da PLA₂), e os anti-inflamatórios não-esteroides (AINE's), cuja ação principal é a inibição direta das enzimas COX, influenciando assim a síntese de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) (RANG *et al.*, 2007).

1.3 Avaliação da atividade anti-inflamatória de produtos naturais por modelos animais

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. As plantas contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido a presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade (MACIEL *et al.*, 2002).

Devido ao grande número de amostras a serem analisadas, alguns aspectos devem ser observados quando se procura princípios ativos em plantas. Neste contexto, devem ser levados em consideração a simplicidade, a rapidez, a reprodutibilidade e o baixo custo dos testes biológicos. Usualmente, são feitas triagens com modelos experimentais menos complexos e após a seleção das substâncias puras ativas, estas são avaliadas em ensaios mais específicos, e posteriormente submetidas à análise do mecanismo de ação biológica (CECHINEL-FILHO & YUNES, 1998).

O *screening* de compostos com propriedades anti-inflamatórias é possível graças a uma infinidade de técnicas *in vitro* (cultura de células e dosagem de mediadores inflamatórios; inibição de enzimas) e *in vivo* (indução de inflamação por

substâncias denominadas agentes flogísticos ou irritantes em modelos animais variados), amplamente utilizados na pesquisa pré-clínica.

O modelo *in vivo* de edema de orelha é amplamente utilizado para demonstrar a atividade tópica de substâncias bioativas em inflamações cutâneas (BLAZSÓ & GÁBOR, 1995; GÁBOR, 2000). Esse modelo se caracteriza por demonstrar resultados rápidos, simplicidade da técnica, reprodutibilidade e baixas possibilidades de erros quando bem aplicado, além de ser um modelo que minimiza uso de animais e de substâncias (GÁBOR, 2000).

Os agentes flogísticos ativam quimicamente um processo inflamatório. Diferentes substâncias com esse potencial podem ativar vias diversas da cascata inflamatória, desencadeando os sinais característicos como edema, aumento de permeabilidade, vasodilatação, eritema. Por ativar vias diversas, a aplicação de diferentes agentes flogísticos (óleo de croton, ácido araquidônico, capsaicina, fenol, histamina) é justificada por seus mecanismos específicos, já conhecidos, na indução do processo inflamatório, cujos resultados obtidos podem sugerir um provável mecanismo da ação anti-inflamatória da substância em estudo (GÁBOR, 2000).

1.4 Óleos fixos

Os óleos fixos são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas) e solúveis em substâncias orgânicas apolares, formadas predominantemente por triglicerídeos ou triacilgliceróis (moléculas que provém do metabolismo primário, formadas por três ácidos graxos esterificados com glicerol e que pelo menos um deles seja insaturado) e com ponto de fusão inferior a 20 °C (MORETTO & FETT, 1998). É importante salientar que os óleos fixos são quimicamente diferentes dos óleos essenciais. Os óleos essenciais (ou etéreos), apesar de possuírem aparência oleosa à temperatura ambiente, são voláteis, solúveis em vapor d'água e apresentam na sua composição substâncias como terpenoides e fenilpropanoides, e não triacilgliceróis (SIMÕES & SPITZER, 2007).

A maioria dos óleos fixos é obtida a partir de sementes, casca do caule e polpa de frutos de vegetais (MORETTO & FETT, 1998; MOYNA & HEINZEN, 2007).

Além dos triacilglicerois, os óleos fixos podem apresentar outros constituintes químicos, só que em menor quantidade: esteróis (β -sitosterol, campesterol e estigmasterol), cerídeos (palmitato de cetila), hidrocarbonetos incolores (esqualeno), carotenoides, tocoferóis, lactonas e metilcetonas. Os carotenoides (β -caroteno) dão a coloração amarelada ou avermelhada característica dos óleos. Os tocoferóis agem como antioxidantes, impedindo a rancidez oxidativa. As lactonas e metilcetonas conferem odor ao óleo. Já os esteróis, os cerídeos e os hidrocarbonetos incolores não influenciam as propriedades organolépticas dos óleos fixos (MORETTO & FETT, 1998).

1.4.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos (Figura 1) são longas cadeias alifáticas de átomos de carbono ligados a hidrogênios, possuindo um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) em uma das extremidades da cadeia. Podem ocorrer na natureza como substâncias livres ou esterificadas (a maior parte com glicerol, formando os glicerídeos) (MOYNA & HEINZEN, 2007).

De acordo com a presença de ligações duplas entre os carbonos da cadeia alifática, os ácidos graxos podem ser classificados como saturados (não possuem ligações duplas entre carbonos); monoinsaturados (possuem uma única ligação dupla entre carbonos) ou poli-insaturados (possuem mais de uma ligação dupla entre carbono) (MORETTO & FETT, 1998).

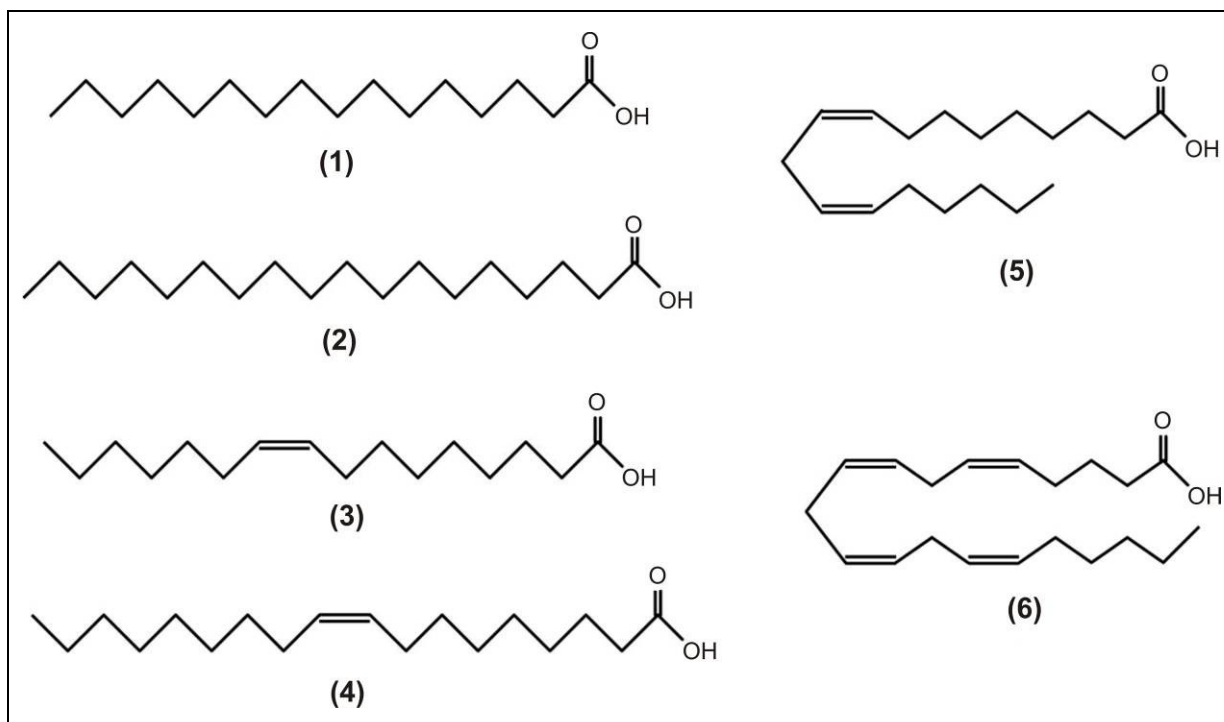


FIGURA 3. Estruturas de ácidos graxos. Os ácidos graxos apresentam uma longa cadeia carbônica alifática e um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) em uma das extremidades. Os ácidos graxos podem ser saturados (não apresentam ligações duplas) ou insaturados (apresentam ligações duplas, monoinsaturados ou poli-insaturados). Ácidos graxos saturados: (1) ácido palmítico; (2) ácido esteárico. Ácidos graxos monoinsaturados: (3) ácido palmitoleico; (4) ácido oleico. Ácidos graxos poli-insaturados: (5) ácido linoleico; (6) ácido araquidônico.

1.4.2 Ações biológicas de óleos fixos

Os óleos fixos, por serem fonte de substâncias energéticas e reguladoras (ácidos graxos, precursores de vitaminas e esteróis), são amplamente utilizados na alimentação humana. No caso da ingestão de ácidos graxos, o consumo de óleos fixos é importante, tendo em vista que são fontes de ácidos graxos essenciais (como o ácido oleico e linoleico), que não são sintetizados nos animais, mas são precursores de ácidos graxos importantes para a homeostase orgânica (por exemplo, o ácido araquidônico) (CALDER, 2001; SIMPOULOS, 2006).

Além da importância nutricional, é atribuída aos óleos propriedades nutracêuticas. Atualmente, são relatados vários benefícios da ingestão de ácidos

graxos poli-insaturados da série ômega-3 (n-3), sob a forma de alimentos fontes e até mesmo de óleo de peixe, que passou a ser consumido em maior abundância, estando relacionado com a prevenção e tratamento de enfermidades cardiovasculares (no combate a arteriosclerose), com as doenças inflamatórias agudas e crônicas, com infecções e ultimamente, prevenindo lesões e alterações imunológicas em atletas (RANG *et al.*, 2007; SIMPOULOS, 2006). Têm-se verificado na literatura o estudo das potencialidades farmacológicas de alguns óleos de origem vegetal e animal e seus ácidos graxos livres: O óleo de prímula (*Oenothera bienis* L.), borago (*Borago officinalis* L.) e tulase (*Ocimum sanctum* L.), ricos em ácido α -linolênico e γ -linolênico, demonstram efeito anti-inflamatório em modelos animais (SINGH *et al.*, 1996; CALDER, 2001). O óleo de peixe, rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA, do inglês *Polyunsaturated Fatty Acid*) n-3 (ácido eicosapentaenoico e ácido docosaenoico), possui efeitos potencialmente importantes quando ingerido na dieta: inibição da função plaquetária, prolongamento do tempo de sangramento, efeitos anti-inflamatórios, ação antiarrítmica e redução do fibrinogênio plasmático (CAMPOS *et al.*, 2002; JAMES *et al.*, 2001; CALDER, 2001). O óleo de mamona (*Ricinus communis* L.) tem ação laxante, propriedade atribuída ao ácido ricinoleico (AWOOUNTERS *et al.*, 1978).

Além disso, os óleos fixos também podem ser utilizados como veículos de outros medicamentos, na preparação de pomadas e linimentos, por seu caráter lipofílico que proporciona boa absorção (WAGNER & WISENAUER, 2006).

1.5 Pequi do Nordeste (*Caryocar coriaceum* Wittm): um fruto da Chapada do Araripe com importância econômica

A Chapada do Araripe, localizada entre os limites dos Estados do Ceará, Pernambuco e Piauí (Figura 3), chama a atenção da comunidade científica por sua estrutura geológica (bacia sedimentar), suas jazidas fossilíferas, seu clima e suas diferentes formações vegetais concentradas num mesmo local, cada uma com fatores bióticos e abióticos específicos: (1) floresta úmida semi-perenifólia, (2) transição floresta úmida / cerrado, (3) carrasco, (4) floresta úmida com incidência de

incêndios e (5) cerrado. (LIMA *et al.*, 1984). Dentre as espécies arbóreas encontradas na biorregião do Araripe, destaca-se o *Caryocar coriaceum* Wittm., oleaginosa da família Caryocaraceae e de grande importância econômica para a região.

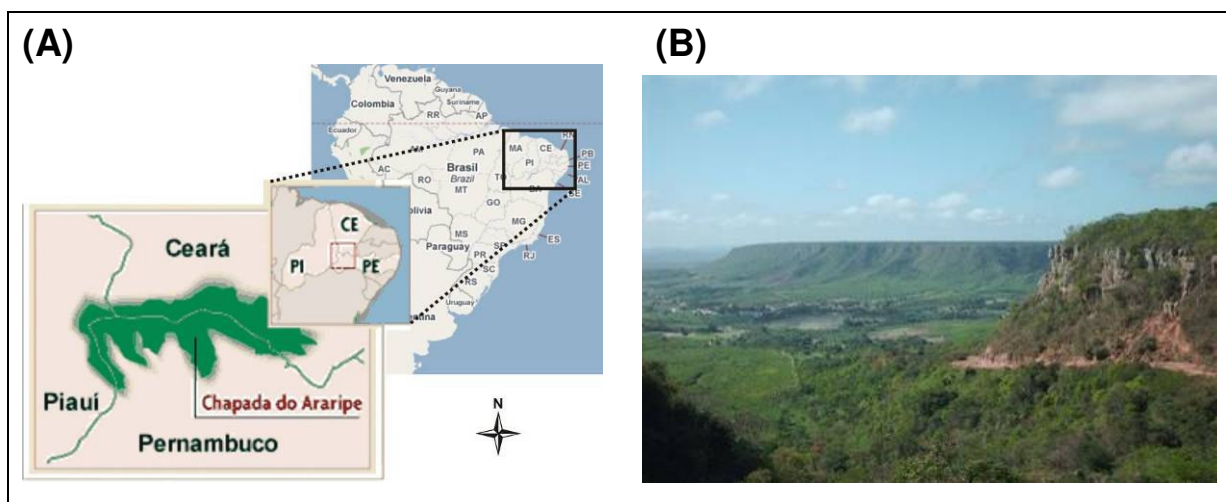


FIGURA 4. Chapada do Araripe. (A) Localização geográfica (em verde), entre os limites dos Estados Ceará, Piauí e Pernambuco; (B) vista da Chapada do Araripe. Fontes: Adaptado de <<http://maps.google.com.br/maps?hl=pt-BR&tab=wl>>; <http://www.geocities.com/cariri_ce/mapa3b.gif>; <http://cariricult.blogspot.com/2009_02_01_archive.html>.

1.5.1 Aspectos botânicos, etnobotânicos e etnofarmacológicos de *Caryocar coriaceum*

A família Caryocaraceae (ordem Malpighiales) compreende um conjunto de plantas de hábito arbóreo e frutos oleaginosos, endêmicas da América tropical e representadas por dois gêneros: *Caryocar* e *Anthodiscus*, com uma média de 25 espécies (BARROSO *et al.*, 1978; STEVENS, 2008). Dentre as espécies do gênero *Caryocar*, destacam-se no Brasil as espécies: *C. brasiliense*, *C. villosum*, *C. coriaceum*, *C. cuneatum* e *C. glabrum*. (ARAÚJO, 1995; PRANCE & SILVA, 2006; PAULA-JÚNIOR, 2004).

A espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. possui um fruto de polpa oleaginosa conhecido popularmente por pequi, piqui, piqui-brabo, piqui da serra, piqui do arisco

ou pequi do Nordeste (SILVA & MEDEIROS-FILHO, 2006ab; RIZZINI, 1978; FERNANDES, 2005; PINTO, 1993). Esta espécie é genuinamente do Nordeste brasileiro e predominante de áreas de cerrado e cerradão da Chapada do Araripe (COSTA *et al.*, 2004), também podendo ser encontrada em chapadões quartzíticos que se estendem desde o Piauí até a Bahia (RIZZINI, 1995). Seu fruto é bastante apreciado na culinária regional, com importância econômica (FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

O nome *Caryocar* vem do grego *caryon* (= núcleo, noz) e *kara* (= cabeça), referindo-se ao fruto globoso (BARROSO *et al.*, 1978). Já o nome “pequi” tem origem indígena (*py-qui*, *py* = pele, casca; *qui* = espinho), significando “casca espinhenta”, decorrente dos espinhos do endocarpo (BRAGA, 1960).

Possui hábito arbóreo, podendo atingir 15 metros de altura e tronco de até 2 metros de diâmetro, revestido de casca escura, grossa e sulcada (Figura 5). As folhas são opostas, ternadas, de folíolos ovais, glabros (sem pelos), verde-luzentes, mais ou menos coriáceas. As flores são grandes, amareladas, com estames vermelhos, reunidas em cachos terminais (Figura 6-B) (BRAGA, 1960). O fruto é drupáceo, ovóide, de consistência carnosa, com epicarpo de coloração verde escura, medindo cerca de 0,1 cm de espessura. O mesocarpo externo, de coloração verde clara, oleaginoso, possui em média 0,8 cm de espessura. O mesocarpo interno, carnoso e de coloração amarelada, é oleaginoso, possuindo forte odor característico e espessuras médias de 1,0 cm, envolvendo o endocarpo de textura lenhosa. O endocarpo é recoberto externamente por acúleos (espinhos) apresentando em média 0,5 cm de comprimento, encravados na porção carnosa do mesocarpo, de coloração castanho escuro externamente e castanho escuro metálico internamente com 0,2 cm de espessura (Figura 6) (BRAGA, 1960; PAULA-JÚNIOR, 2004; SILVA & MEDEIROS-FILHO, 2006a).

É importante salientar que não se deve confundir o *C. coriaceum* Wittm. com outras espécies diferentes, mas do mesmo gênero e também conhecidas popularmente por pequi no Brasil e que são amplamente utilizadas na culinária: *C. brasiliense* Camb., predominante das regiões de cerrado do sul da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Goiás, Pará, Maranhão, Mato Grosso e Tocantins (ARAÚJO, 1995; KEER *et al.*, 2007), difere de *C. coriaceum* por possuir folíolos providos de pelos e espesso (*C. coriaceum* apresenta folíolos glabros, sem barbelas axilares nas nervuras e ápice obtuso) (RIZZINI, 1978); *C. villosum* (Aubl.) Pers.,

conhecido como pequiá e comum na Amazônia Central (PRANCE & SILVA, 2006; MARTINS & GRIBEL, 2007), também possui folíolos providos de pelos, mas de espessura fina, diferindo de *C. brasiliense* (RIZZINI, 1978).



FIGURA 5. Árvore de *Caryocar coriaceum* Wittm (pequizeiro). Localizada numa área de cerrado da Chapada do Araripe. Crato-CE. Março de 2009.

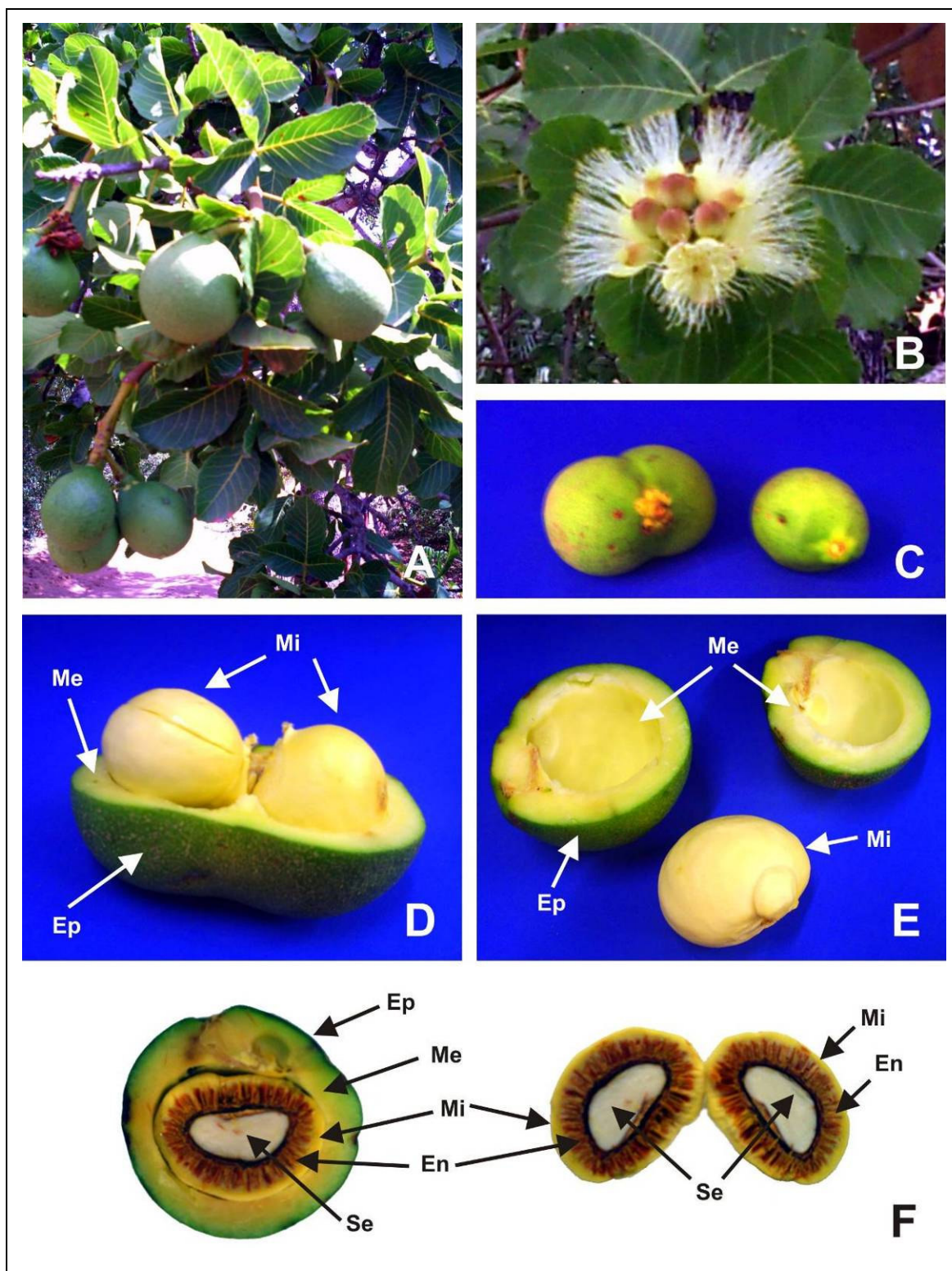


FIGURA 6. Aspecto das folhas, frutos e flor de *C. coriaceum* Wittm. A folha é trifoliolada e glabra (A e B). As flores (B) são amareladas, com estames avermelhados e reunidas em cachos terminais. Os frutos são drupáceos. Notar os aspectos externo (A e C) e interno (D, E e F, corte mediano sagital) dos frutos. Ep – epicarpo; Me – mesocarpio externo; Mi – mesocarpio interno (polpa); En – endocarpio (com acúleos ou espinhos); Se – semente (amêndoa).

Quanto ao período de floração e frutificação, o *C. coriaceum* tem comportamento sazonal, sendo que a floração ocorre entre os meses de Setembro e Novembro e a frutificação entre os meses de Dezembro e Abril, período este conhecido como safra do pequi e que coincide com os altos índices pluviométricos no interior do Nordeste brasileiro (BRAGA, 1960; COSTA *et al.*, 2004).

É no período da safra do pequi onde as comunidades próximas à chapada do Araripe realizam atividades extrativistas (em condições precárias de trabalho), coletando os frutos para comercialização (AUGUSTO & GÓES, 2007). A coleta não é feita com a retirada do fruto diretamente da árvore; espera-se que o fruto caia no chão para que se possa coletá-lo posteriormente, pois o sabor da polpa do fruto coletado “do chão” é mais agradável. A polpa e a amêndoa (porções oleaginosas comestíveis do fruto), por seu sabor característico e por ser fonte de lipídios e vitaminas antioxidantes (A e E), são bastante aproveitadas como alimento e na preparação de molhos e temperos, acompanhando pratos regionais e substituindo outras fontes de lipídios, como a banha ou o toucinho. Devido ao preço acessível, o pequi constitui um precioso recurso alimentar para a população de baixa renda (FIGUEIREDO *et al.*, 1989; BRAGA, 1960; SILVA & MEDEIROS-FILHO, 2006a).

Além de ser utilizado como alimento, o pequi também é aproveitado para a produção de óleo, complementando o trabalho na pós-colheita e sendo mais uma fonte de renda (AUGUSTO & GÓES, 2007). O óleo, produzido de forma artesanal, é extraído através de fervura intensa do fruto sem casca em uma panela de ferro com água, por algumas horas, até obter um sobrenadante da parte gordurosa. Retira-se com uma colher a parte oleosa que, aos poucos, sobe à tona da água, obtendo-se dessa forma o óleo de pequi (FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

O conhecimento popular atribui ao óleo de pequi grande aplicabilidade medicinal. Estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos apontam sua utilização no tratamento de gripes e infecções bronco-pulmonares (puro ou em associação com mel de abelha), inflamações da garganta, reumatismo, úlceras externas, dores musculares e inflamações da pele (FRANCO & BARROS, 2006; SILVA & MEDEIROS-FILHO, 2006b; OLIVEIRA *et al.*, 2007; AGRA *et al.*, 2007). O óleo também tem aplicabilidade veterinária, sendo usado em cortes, contusões, pisaduras e inchaços de animais (BRAGA, 1960; FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

Ao fruto também é atribuído propriedades afrodisíacas e antiabortivas (FIGUEIREDO *et al.*, 1989). Além da polpa do fruto, as folhas do pequizeiro também são utilizadas, na forma de decocto, contra gripes, resfriados e disfunções menstruais (AGRA *et al.*, 2007). As mesmas aplicações populares citadas acima são observadas também em trabalhos de etnobotânica e etnofarmacologia abordando o óleo obtido do fruto de outras espécies do gênero *Caryocar*, como o *C. brasiliense* e *C. cuneatum*. Os estudos etnobotânicos ainda apontam o uso do óleo de *C. brasiliense* contra tumores (AGRA *et al.*, 2007; RODRIGUES & CARVALHO, 2001; GUARIM-NETO & MORAIS, 2003; SOUZA & FELFILI, 2006).

1.5.2 Estudos fitoquímicos do gênero ***Caryocar***

Nos últimos anos, alguns estudos têm identificado o perfil fitoquímico de plantas do gênero *Caryocar*. As avaliações realizadas por Perez (2004) demonstram a presença de várias substâncias na espécie *Caryocar brasiliense* Camb: o mesocarpo interno mais endocarpo do fruto apresentam heterosídeos flavônicos, heterosídeos saponínicos, ácidos fixos, taninos condensados e açúcares; o exocarpo do fruto sugeriu a presença de esteróides e triterpenos, heterosídeos antraquinônicos, heterosídeos flavônicos; heterosídeos saponínicos, aminogrupos, taninos condensados e hidrolisáveis e açúcares (PEREZ, 2004).

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) dos óleos essenciais da semente e da folha de *C. brasiliense* revelou uma série de compostos, sendo que o componente majoritário do óleo essencial das sementes de *C. brasiliense* foi o hexanoato de etila, enquanto que o óleo essencial das folhas apresentou octacosano, heptadecano e hexadecanol (PASSOS *et al.*, 2003).

Ao identificar carotenóides na polpa de *C. brasiliense* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de massas (EM), os estudos de Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2004) revelaram a presença de violaxantina, luteína, zeaxantina e pequenos percentuais de β -criptoxantina, β -caroteno e neoxantina.

São poucos os estudos fitoquímicos de *C. coriaceum* Wittm. Figueiredo e colaboradores (1989) analisaram a composição química do óleo da polpa do pequi obtido de duas formas: artesanal e em laboratório (com solvente orgânico hexano) e identificaram em ambos a presença de ácidos graxos mono e poli-insaturados: ácido oleico, palmítico, esteárico e linoleico. O ácido oleico foi a substância majoritária encontrada (em torno de 54%), não havendo diferenças significativas entre os percentuais de cada substância no óleo obtido das duas formas (FIGUEIREDO *et al.*, 1989).

1.5.3 Atividades biológicas de produtos naturais do gênero **Caryocar**

A partir das observações etnobotânicas, muitos estudos foram realizados com o objetivo de identificar possíveis atividades biológicas do gênero *Caryocar*. Por sua localização geográfica (estando mais acessível a grandes centros de pesquisa brasileiros), o *C. brasiliense* é a espécie mais estudada. Foram comprovadas várias atividades biológicas de extratos de *C. brasiliense*, como a ação moluscicida de controle ao vetor da esquistossomose (*Biomphalaria glabrata*) (BEZERRA *et al.*, 2002) e a verificação de baixa citotoxicidade de frações de pequi sobre organismos aquáticos (MOTTER *et al.*, 2004), a ação antibactericida sobre colônias de *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*; (ALVES *et al.*, 2000); a ação antifúngica no combate ao *Cryptococcus neoformans*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Candida albicans* (PASSOS *et al.*, 2002), a ação antiprotozoária no combate ao *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania amazonensis* e *Toxoplasma gondii* (HERZOG-SOARES *et al.*, 2002; PAULA-JÚNIOR, 2004), as propriedades antioxidantes e preventivas de tumores (PAULA-JÚNIOR, 2004; KHOURI *et al.*, 2007), efeitos contra o Sarcoma 180 em animais pelo conteúdo de ácido oleanólico e indícios de atividade proteásica e hemolítica de lectinas de *C. brasiliense*, bem como atividade enterotóxica *in vivo* em camundongos (PEREZ, 2004).

Ensaio pré-clínicos do óleo fixo de *C. coriaceum* realizados por nosso grupo apontam a atividade gastroprotetora em roedores com significativa redução de úlceras induzidas por etanol e aspirina (PENHA, 2007; QUIRINO, 2009) e cicatrizante (QUIRINO, 2009).

Enfim, perante os dados fitoquímicos, etnobotânicos, etnofarmacológicos e quimiosistemáticos disponíveis, fica demonstrada a relevância quanto à busca de se conhecer potencialidades farmacológicas de extratos do *C. coriaceum*, podendo assim descobrir nessa planta, tão importante economicamente, um poderoso fitoterápico aliado ao desenvolvimento de novas terapias e, ao mesmo tempo, salienta a importância de sua conservação.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar o efeito antiedematogênico do óleo fixo (extração em acetato de etila) do mesocarpo interno (polpa do fruto) do pequi do nordeste (*C. coriaceum* Wittm) (OFCC) sobre inflamações induzidas por diferentes agentes irritantes em modelos *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar a segurança da administração do OFCC em tratamentos tópicos através de ensaio de atividade fotossensibilizante *in vitro*;
- Conhecer a dose terapêutica do OFCC nos modelos animais;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do OFCC por via tópica (ação local) através do modelo de edema de orelha induzido por óleo de croton (modelo agudo e crônico), ácido araquidônico, capsaicina, fenol e histamina;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do OFCC por via oral (ação sistêmica) através do modelo de edema de pata induzido por carragenina.
- Propor possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória do OFCC com base nos resultados *in vivo* obtidos e nos estudos fitoquímicos;
- Correlacionar os dados observados com informações da literatura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos da pesquisa

Toda a proposta da pesquisa está em conformidade com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo seres vivos: *Guide for the care and use of laboratory animals*, do NIH - *National Institute of Health-EUA*; Lei Federal Nº 11.794/2008; Princípios Éticos da Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA; e Lei Federal Nº 9605/1998 (BAZZANO, 2006; MACHADO *et al.*, 2006; BRASIL, 2008). O projeto com protocolos referentes a este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), com parecer Nº 2009_0218.

3.2 Materiais utilizados

3.2.1 Drogas, reagentes e soluções

As substâncias utilizadas nos ensaios encontram-se relacionadas, com suas respectivas procedências, na tabela 1:

TABELA 1. Substâncias utilizadas nos ensaios biológicos.

SUBSTÂNCIA	ORIGEM
• 8-metoxipsoraleína	Galderma, Alemanha
• Acetato de etila P.A.	Dinâmica, Brasil
• Acetona P.A. (propan-2-ona)	Dinâmica, Brasil
• Ácido acético P.A.	Fluka, Alemanha
• Ácido araquidônico	Sigma, USA
• Capsaicina	Sigma, USA
• Carragenina	Sigma, USA

TABELA 1 (Continuação). Substâncias utilizadas nos ensaios biológicos.

SUBSTÂNCIA	ORIGEM
• Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®)	Syntec, Brasil
• Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®)	Syntec, Brasil
• Dexametasona (Decadron®)	Ache, Brasil
• Dimetilsulfóxido	Merck, Alemanha
• Etanol P.A.	Dinâmica, Brasil
• Éter etílico	Dinâmica, Brasil
• Fenol 99%	Sigma-Aldrich, USA
• Formalina	Fluka, Alemanha
• Histamina	Sigma, USA
• Indometacina (Indocid®)	Merck Sharp & Dohme, Brasil
• Óleo de croton	Sigma, USA
• Norfloxacin	Laborclin, Brasil
• Solução fisiológica NaCl 0,9%	FARMACE, Brasil
• Tween 80	Sigma-Aldrich, USA

3.2.2 Material permanente e equipamentos utilizados

- Balança analítica de precisão (Metler Toledo AB204)
- Banho-maria (Modelo 100, Fanem Ltda.)
- Cronômetros digitais (LivStar)
- Cânulas de gavagem para ratos e camundongos
- Estufa de secagem e esterilização
- Extrator de Soxhlet
- Hidropletismógrafo
- Lâmpadas Sylvania F20T12-BLB
- Materiais de biossegurança
- Material cirúrgico
- Paquímetro digital (Jomarca, Ref. Nº 205509)
- Perfurador de couro (circunferência de 6 mm Ø)
- Pipetas automáticas (Maxipette)

- Rotaevaporador (Fisatom)
- Seringas estéreis (1 mL, 3 mL e 5 mL)
- Tubos Eppendorffs
- Vidrarias gerais

3.2.3 Material botânico

Os frutos utilizados para obtenção do óleo fixo do mesocarpo interno (polpa) foram obtidos a partir de espécies de *C. coriaceum* Wittm. existentes numa área de cerrado da Chapada do Araripe (Fazenda Barreiro Grande, Crato-CE, 7°21'53,1" S; 39°28'42,6" W; altitude: 892 m), adquiridos no mês de janeiro de 2009 através de moradores locais. A exsicata da planta (Figura 7) foi coletada em outubro de 2008 (período de floração), identificada pela prof^a Dr^a Lígia Queiroz Matias e depositada no Herbário Prisco Bezerra (Universidade Federal do Ceará), sob o N^o 44523.



FIGURA 7. Exsicata de pequizeiro (*C. coriaceum* Wittm). Coletada em outubro de 2008 (período de floração), numa área de cerrado da chapada do Araripe, Crato-CE (7°21'53,1" S; 39°28'42,6" W; altitude: 892 m).

3.2.4 Animais

Foram utilizadas nos ensaios *in vivo* duas espécies de roedores: camundongos *Swiss (Mus musculus)*, com massa corpórea entre 25-35 g e ratos *Wistar (Rattus norvegicus)* albinos, com massa corpórea entre 200-300 g, de ambos os sexos, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e pela Faculdade Leão Sampaio (FLS) e monitorados no Biotério Experimental da URCA, em conformidade com as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios (CARDOSO, 1998-2001) e bioéticas (BAZZANO, 2006). Os mesmos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura entre 23 ± 2 °C, ciclo claro/escuro de 12 h e com livre acesso à água potável e ração específica para roedores (Labina, Purina®).

3.2.5 Micro-organismos para teste de atividade fotossensibilizante

Para o teste de atividade fotossensibilizante do OFCC, foram utilizados micro-organismos obtidos através do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde. Foram utilizadas duas linhagens padrão de bactérias: *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Os ensaios de atividade fotossensibilizante foram conduzidos pelo prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho, da Universidade Regional do Cariri (URCA), no Laboratório de Genética e Microbiologia, Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

3.3 Obtenção do óleo fixo do mesocarpo interno de *Caryocar coriaceum*

A polpa *in natura* dos frutos de *C. coriaceum* foi retirada manualmente com auxílio de um objeto cortante (faca), separando o mesocarpo interno do endocarpo (porção resistente do fruto, onde apresenta espinhos e amêndoa). A polpa obtida (104,14 g) foi colocada num extrator de *Soxhlet* em contato com solvente acetato de etila por 3 horas (extração a quente). No final do processo, obteve-se uma solução de cor amarelada (óleo + acetato de etila), com um precipitado de cor amarelo-alaranjado. O precipitado foi separado da solução amarelada por decantação, através de um funil de separação. Posteriormente, a solução amarelada foi submetida à rotaevaporação (rotaevaporador Fisatom), seguido de aquecimento em banho-maria com temperatura controlada ($70 \pm 2^\circ\text{C}$), objetivando retirar o acetato de etila residual e evitar a decomposição de substâncias termossensíveis do óleo. O óleo demonstrou rendimento de 5,17%.

Para posterior utilização nos ensaios, alíquotas do OFCC foram estocadas em tubos *Eppendorff* (250 μL) e armazenadas a -20°C .

3.4 Identificação dos ácidos graxos do OFCC

Os ácidos graxos componentes foram obtidos como seus ésteres metílicos, após a remoção do solvente. Uma amostra de 0,2 g do OFCC foi submetida a refluxo durante 30 min, com hidróxido de potássio metanólico (HARTMAN & LAGO, 1973). Em seguida, os ácidos graxos livres e totais do OFCC foram convertidos em ésteres metílicos por metanólise com catalisador ácido. Posteriormente, os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa (GC) em um Hewlett-Packard 5971, equipado com coluna capilar e detector de ionização de chama (FID). As condições operacionais foram: forno em temperatura de $35-180^\circ\text{C}$ a uma taxa de $4^\circ\text{C}/\text{min}$, em seguida, aquecida a uma taxa de $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até 250°C e depois mantida isotermicamente; temperatura do injetor e do detector de 250 e 200°C , respectivamente, gás hidrogênio (H_2) como gás de transporte e com fluxo de $0,8 \text{ mL}/\text{min}$. A identificação foi realizada por co-injeção de compostos autênticos e

pelos tempos de retenção. Valores de percentagem da superfície foram obtidos por via eletrônica a partir da resposta GC-FID.

3.5 Atividade fotossensibilizante dos constituintes do OFCC sob luz ultravioleta A (UVA) em cultura de linhagens de micro-organismos

Em aplicações cutâneas, substâncias fotossensíveis (capazes de se tornarem tóxicas após exposição à luz ultravioleta A (UVA) podem desencadear reações cutâneas indesejáveis, desencadeando lesões locais e inflamação (TISSERAND & BALACS, 1995). A possibilidade de interação dos compostos do OFCC com a luz UVA foi testada seguindo procedimentos *in vitro* padronizados por Lopes e colaboradores (2001), utilizando micro-organismos.

O preparo da solução inicial da amostra observou as seguintes proporções: 200 mg do OFCC foram solubilizados em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma concentração inicial de 200 mg/mL. A partir desta concentração, foi efetuada uma diluição 1:20 em água destilada estéril (10 mg/mL) (modificado a partir de NAIR *et al.*, 2005 e SAHIN *et al.*, 2004).

Nestes ensaios foram utilizadas as linhagens padrão de *E. coli* e *S. aureus*. O ensaio foi realizado através do método de difusão em ágar, modalidade em disco (*Agar Disk Diffusion*). Foram utilizados como controles positivos discos de norfloxacin (10 µg) e discos *Blank* com 20 mL de 8-metoxipsoraléina (8-MOP) dissolvida em etanol para fotoativação. Para visualizar o efeito fototóxico, cada placa foi preparada em réplica: uma réplica foi exposta à luz UVA ($\lambda = 320\text{--}400$ nm, quatro lâmpadas Sylvania F20T12-BLB, emissão máxima: 350 nm) por 2 horas. Após isso, as placas expostas à luz foram incubadas a 37°C por 24 h. A outra réplica foi diretamente colocada na estufa a 37°C para incubação, sem contato com a luz UVA enquanto a outra foi mantida no escuro. A leitura foi realizada através da aferição do tamanho das zonas de inibição (mm) e a atividade fototóxica foi avaliada através da comparação entre as duas réplicas.

3.6 Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica do OFCC através de modelos de edema de orelha induzido por agentes irritantes em camundongos *Swiss*

3.6.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton

O óleo de croton é um agente flogístico que possui como constituintes químicos ésteres de forbol, sendo o TPA (ácido 13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol) o agente com potencial irritante. Sua aplicação estimula a liberação de vários mediadores da inflamação, como aminas vasoativas (histamina e serotonina) e derivados do ácido araquidônico (LAPA, 2003). Pelas características visíveis de inflamação cutânea, esse modelo também é bem representativo de dermatites como a psoríase (GABOR, 2000).

Para avaliar a atividade tópica por tratamento agudo do OFCC neste modelo, grupos de camundongos *Swiss* (n = 6) tiveram suas orelhas direitas tratadas, topicamente, com 20 µL de Tween 80 2 % em salina, indometacina 100 mg/mL (2 mg/orelha), dexametasona 4 mg/mL (0,08 mg/orelha), OFCC em Tween 80 2% nas concentrações 50, 100, 200 e 400 mg/mL (1, 2, 4 e 8 mg/orelha, respectivamente) ou OFCC bruto (20 µL = 13 mg de OFCC), esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de óleo de croton 5% (v/v) em acetona foram aplicados topicamente na orelha direita e 20 µL do veículo acetona na orelha esquerda. Após 6 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas através de um *punch* (perfurador de couro metálico) para avaliação do edema, conforme item 3.6.7 (TUBARO, 1985).

Num outro momento, buscou-se também avaliar se o OFCC é capaz de potencializar o efeito de um inibidor da síntese de prostaglandinas. Para isso, as orelhas direitas de camundongos *Swiss* (n = 6 / grupo) foram pré-tratadas, topicamente, com 20 µL de salina, indometacina 1 mg/orelha (50 mg/mL), OFCC 4 mg/orelha e associação indometacina 1 mg/orelha + OFCC 4 mg/orelha, esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de óleo de croton 2,5% (v/v) diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 µL do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 6 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento

cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para análise do edema conforme item 3.6.7.

3.6.2 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton

No intuito de avaliar o efeito anti-inflamatório do OFCC em um processo inflamatório crônico, já estabelecido, foi utilizado um modelo com a aplicação múltipla do óleo de croton. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação de 20 μ L de óleo de croton 5% (v/v) em acetona em dias alternados, durante 9 dias, em camundongos *Swiss* (n = 6/grupo). O OFCC (13 mg/orelha) e a dexametasona (0,1 mg/orelha, controle positivo) foram aplicados por via tópica durante 4 dias (2 vezes ao dia) a partir do 5º dia do experimento, sendo o edema avaliado diariamente através de medição da espessura da orelha direita. No 9º dia do experimento, os animais foram sacrificados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados para avaliação do edema (STANLEY *et al.*, 1991).

3.6.3 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

O ácido araquidônico é um ácido graxo importante na produção de eicosanóides mediadores da inflamação (prostaglandinas e leucotrienos). Drogas, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINE's) ou inibidoras da 5-lipoxigenase (5-LOX), demonstram redução significativa no percentual de inflamação induzido neste modelo. Para avaliar a atividade tópica do OFCC neste modelo, as orelhas direitas de camundongos *Swiss* (n = 6 / grupo) foram tratadas, topicamente, com 20 μ L de solução salina (controle negativo); indometacina 100 mg/mL, dexametasona 4 mg/mL (controles positivos) ou OFCC bruto, esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 μ L de ácido araquidônico 0,1 mg/ μ L diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 μ L do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 1 hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de

diâmetro foram obtidos das orelhas para avaliação do edema, conforme item 3.6.7 (YOUNG *et al*, 1984; CRUMMEY *et al*, 1987).

3.6.4 Edema de orelha induzido por capsaicina

A capsaicina, quando aplicada topicamente, induz a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios neurogênicos (substância P, taquicininas), que promovem vasodilatação e eritema como resposta imediata, seguido da formação de edema. Na avaliação da atividade tópica do OFCC nesse modelo, as orelhas direitas de camundongos Swiss (n = 6 / grupo) foram tratadas, topicamente, com 20 µL de salina, dexametasona 4 mg/mL ou OFCC bruto e esperou-se 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de capsaicina 0,01 mg/µL diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 µL do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 30 minutos (pico máximo de formação de edema), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para avaliação do edema, conforme item 3.6.7 (GÁBOR & RAZGA, 1992).

3.6.5 Edema de orelha induzido pela injeção subcutânea de histamina

Este modelo visa a avaliação do efeito do OFCC na reação de hipersensibilidade imediata. Inicialmente, cada animal (n = 6 / grupo) foi anestesiado com cloridrato de cetamina 0,02 mL (i.p.) e cloridrato de xilazina 0,01 mL (i.p.). Em seguida, os animais foram pré-tratados topicamente com 20 µL de salina, dexametasona 4 mg/mL (0,08 mg/orelha) ou OFCC bruto (13 mg/orelha). Após 30 minutos, administrou-se um volume de 5 µL de uma solução de histamina (100 mg/mL de salina), intradermicamente, na região ventral da orelha direita dos camundongos com o auxílio de uma agulha hipodérmica 29 G, enquanto que a orelha esquerda recebeu o mesmo volume de salina, também intradermicamente (Sham). Após 2 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e

para posterior avaliação do edema a partir das massas dos discos obtidos, conforme item 3.6.7 (BRAND *et al*, 2002).

3.6.6 Edema de orelha induzido por fenol

O fenol é um irritante cuja aplicação tópica desencadeia uma inflamação semelhante à dermatite de contato irritativa. Nessa avaliação, as orelhas direitas de camundongos Swiss (n = 6 / grupo) foram pré-tratadas, topicamente, com 20 µL de solução salina, dexametasona 4 mg/mL ou OFCC bruto, esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de fenol 10% (v/v) diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 µL do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 1 hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para análise do edema conforme item 3.6.7 (GÁBOR, 2000).

3.6.7 Quantificação do edema e do efeito inibitório médio

Para quantificar o percentual de inflamação em cada animal analisado, foram obtidos discos de 6 mm de diâmetro: um da orelha direita (tratada com agente flogístico) e outro da orelha esquerda (tratada com veículo do agente flogístico). Em seguida, cada disco obtido teve sua massa mensurada com a utilização de balança analítica (Metler Toledo AB204). O edema de orelha, expresso em percentual de aumento da massa da orelha, foi calculado utilizando a fórmula:

$$\text{Percentual de edema (\%)} = \frac{m_{od} - m_{oe}}{m_{oe}} \times 100$$

onde m_{od} é a massa (em gramas) do disco obtido da orelha direita e m_{oe} é a massa (em gramas) do disco obtido da orelha esquerda.

Já o cálculo do efeito inibitório médio da inflamação (**EIM**, em %) de cada tratamento, procedeu-se aplicando a fórmula a seguir:

$$EIM (\%) = \left(\frac{MPE_{cont} - MPE_{trat}}{MPE_{cont}} \right) \times 100$$

onde MPE_{trat} (em %) é a média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento com OFCC ou fármaco padrão e MPE_{cont} (em %) é a média do percentual de edema do grupo controle negativo (tratado com salina ou salina em 2% de Tween 80).

3.6.8 Análise histopatológica

As amostras dos discos das orelhas cujo edema foi induzido pela aplicação aguda de óleo de croton e ácido araquidônico foram fixadas numa solução de etanol 70% por 24 horas e depois conservadas em formol 10%. Posteriormente, as orelhas foram desidratadas, blocadas em parafina e em seguida seccionadas num micrótomo em cortes de 5 μ m, seguidas da coração em hematoxilina e eosina. A partir de áreas representativas dos tecidos observados, avaliou-se parâmetros qualitativos como: infiltração de leucócitos, intensidade do edema e a espessura da epiderme e derme, através de microscopia óptica com aumento de 200x.

3.7 Avaliação do efeito anti-inflamatório do OFCC com tratamento por via oral: edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*

A carragenina é uma substância que, quando aplicada, induz no local a liberação de vários mediadores da inflamação, como aminas vasoativas (histamina e serotonina), cininas e metabólitos derivados do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos). Grupos de 6 ratos *Wistar*, de ambos os sexos, tiveram o volume inicial (V_i) da pata posterior direita registrado através de um hidropletismógrafo. Em seguida, os animais foram pré-tratados, por via oral, com veículo Tween 80 a 2% em salina, 10 mg/kg (grupo controle negativo); indometacina 10 mg/kg ou OFCC solubilizado em Tween 80 a 2% em solução salina nas doses de 200 e 400 mg/kg. Após 1 hora, receberam uma injeção intraplantar de carragenina 2% (p/v) na pata posterior direita (0,2 mL/pata). O volume da pata traseira direita de cada animal foi avaliado novamente através do hidropletismógrafo após 1, 2, 3 e 4 h da injeção do agente flogístico (carragenina). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (V_f) e o volume inicial (V_i), representados pela fórmula: $V_e = V_f - V_i$, onde V_e representa o volume do edema (em mL). (WINTER *et al.*, 1962).

3.8 Análise estatística dos dados

Os dados apresentados são expressos em média \pm erro-padrão da média (E.P.M.). Para os ensaios que possuem três ou mais grupos e uma única avaliação das amostras, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguindo-se do teste de Student-Newman-Keuls. Para os ensaios que possuem três ou mais grupos e cuja avaliação das amostras se deu em vários intervalos de tempo (edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton), as diferenças entre os grupos foram submetidas à ANOVA de duas vias, com medidas repetidas, seguindo-se do teste de Bonferroni. Foram consideradas diferenças significativas valores de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Ácidos graxos presentes no OFCC

A partir da análise de CG/EM, o OFCC foi caracterizado por um teor elevado de ácidos graxos insaturados (64,9%), sendo os ácidos oleico e palmítico os componentes majoritários. Outros componentes encontrados foram: ácido palmitoleico (0,27%), ácido esteárico (1,73%), ácido linoléico (1,80%), ácido heptadecenoico (5,86%) e ácido 11-eicosenoico (0,37%). Os ácidos graxos, com seus respectivos percentuais, são mostrados na tabela 2.

TABELA 2. Ácidos graxos identificados no OFCC através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM).

ÁCIDO GRAXO	ESQUELETO CARBÔNICO*	PERCENTUAL (%)
Ácido palmitoleico	16:1(Δ^9)	0,27
Ácido palmítico	16:0	34,18
Ácido linoleico	18:2($\Delta^{9,12}$)	1,80
Ácido oléico	18:1(Δ^9)	55,79
Ácido esteárico	18:0	1,73
Ácido heptadecenoico	17:1(Δ^9)	5,86
Ácido 11-eicosenoico	20:1(Δ^{11})	0,37

* **Notação:** na representação **a:b(Δ^c)**, “**a**” corresponde ao número de carbonos da cadeia alifática, “**b**” representa o número de insaturações (duplas ligações) e “**c**” os carbonos nos quais apresentam a insaturação).

4.2 Efeito fotossensibilizante / fototóxico do OFCC sob luz UVA em cultura de linhagens de micro-organismos

O OFCC (em veículo DMSO) não demonstrou atividade fototóxica contra cepas de *E. coli* e *S. aureus* quando em contato com a luz UVA, nem atividade antimicrobiana, por não demonstrar halo de inibição. A 8-MOP demonstrou atividade fototóxica nas duas cepas com presença da luz UVA (devido a observação de halo de inibição), mas não na ausência. A norfloxacin (quinolona de atividade antibacteriana) demonstrou atividade inibitória das cepas testadas tanto na presença quanto na ausência da luz UVA. O DMSO (veículo) também não demonstrou atividade fototóxica nem inibitória das cepas (Tabela 3).

TABELA 3. Atividade fototóxica do OFCC em ensaios fotomicrobiológicos com cepas de *S. aureus* e *E. coli*. Os dados numéricos apresentados correspondem ao tamanho do halo de inibição de crescimento bacteriano (em mm) em cada placa.

Tratamento ⁽¹⁾	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>	
	Escuro ⁽²⁾	Luz UVA ⁽²⁾	Escuro ⁽²⁾	Luz UVA ⁽²⁾
OFCC + DMSO	–	–	–	–
8-MOP	–	16	–	13
NOR	25	32	28	33
DMSO	–	–	–	–

¹OFCC + DMSO: Óleo fixo de *C. coriaceum* em dimetilsulfóxido; 8-MOP: 8-metoxipsoraleína; NOR: norfloxacin; DMSO: dimetilsulfóxido.

²Resultados expressos pela ausência (–) ou presença de zona de inibição de crescimento (dado numérico: tamanho do halo em mm).

4.3 Efeito do tratamento tópico do OFCC nos modelos de inflamação cutânea

4.3.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton

Após 6 horas, observou-se intenso edema e eritema na orelha direita tratada com solução de óleo de croton, comparando à orelha tratada apenas com veículo acetona. O percentual de edema (PE) no grupo tratado com veículo 2% de Tween 80 em salina (controle negativo) foi o maior entre todos os grupos ($167,3 \pm 9,6\%$). A aplicação do OFCC bruto (20 μ L/orelha) (PE: $113,8 \pm 14,4\%$) e solubilizado em 2% de Tween 80 na concentração 400 mg/mL (8 mg/orelha) (PE: $119,7 \pm 9,5\%$) foi capaz de reduzir significativamente ($P < 0,05$) o percentual de edema de orelha comparado com o grupo controle negativo, demonstrando efeito inibitório médio de inflamação (EIM) de 32,0% e 28,5%, respectivamente (Figura 8).

A indometacina e a dexametasona, aplicadas topicamente, também demonstraram redução significativa comparada com o controle negativo, sendo que o grupo tratado com dexametasona apresentou o menor percentual de edema ($24,50 \pm 2,7\%$) e maior EIM (85,4%), diferindo significativamente do grupo tratado com indometacina (PE: $109,2 \pm 15,0\%$; EIM: 34,7%), do OFCC 8 mg/orelha e do OFCC bruto (Figura 8). O efeito do OFCC não ocorreu de forma concentração-dependente.

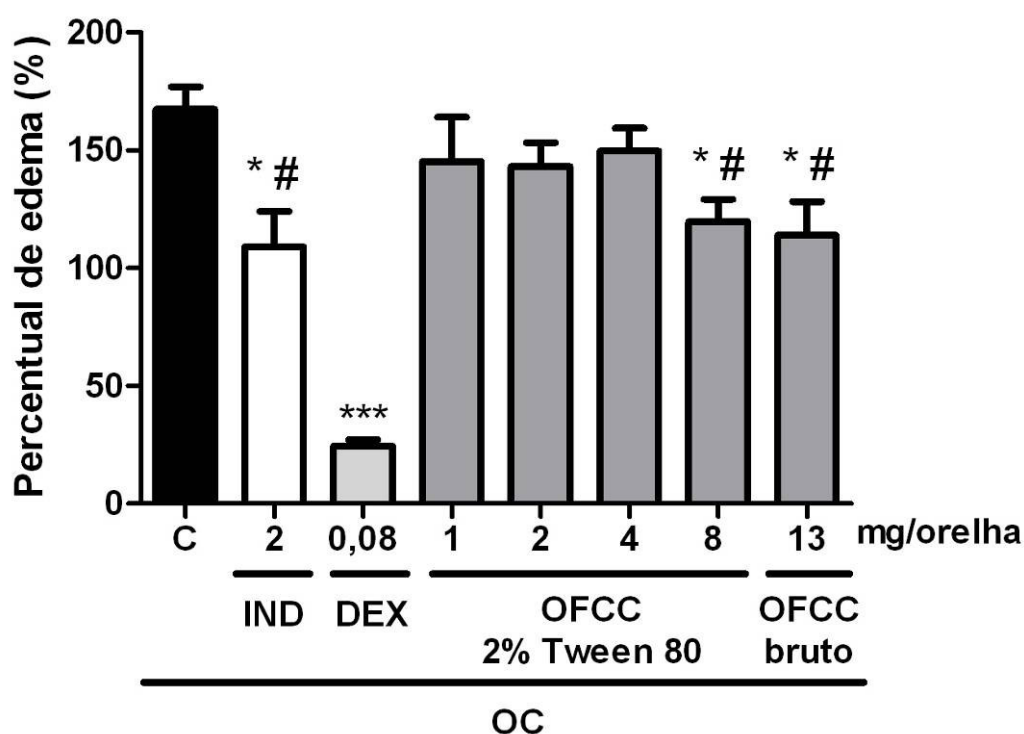


FIGURA 8. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton (OC) em camundongos *Swiss*. Os animais foram pré-tratados com salina em Tween 80 2% (C), indometacina (IND), dexametasona (DEX), OFCC em Tween 80 2% nas doses 1, 2, 4 e 8 mg/orelha e OFCC bruto (13 mg/orelha) e após 15 minutos, receberam topicamente solução de óleo de croton 5% (v/v) em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 6 horas de aplicação do óleo de croton. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo; # $P < 0,01$ comparados ao grupo tratado com dexametasona. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls).

Ao analisar os cortes histológicos das orelhas submetidas à aplicação única de óleo de croton, observou-se na orelha inflamada tratada com veículo (Tween 80, Figura 9-A) um significativo aumento da espessura da derme acompanhado de afrouxamento do tecido conjuntivo por desorganização das fibras da matriz extracelular, hiperplasia epidérmica e um grande número de infiltrado de células inflamatórias, quando comparados à orelha não inflamada (Figura 9-E, veículo acetona). As orelhas tratadas com dexametasona, indometacina e OFCC bruto demonstraram uma redução no infiltrado de células inflamatórias e menor espessura da derme (Área 2, Figuras 9-B,C,D) quando comparadas à orelha inflamada tratada com salina (Figura 9-A), sendo que nas orelhas tratadas com dexametasona (Figura 9-C) o efeito foi mais evidente. Os cortes histológicos das orelhas tratadas com OFCC demonstraram discreta melhora quando comparada a orelha inflamada controle.

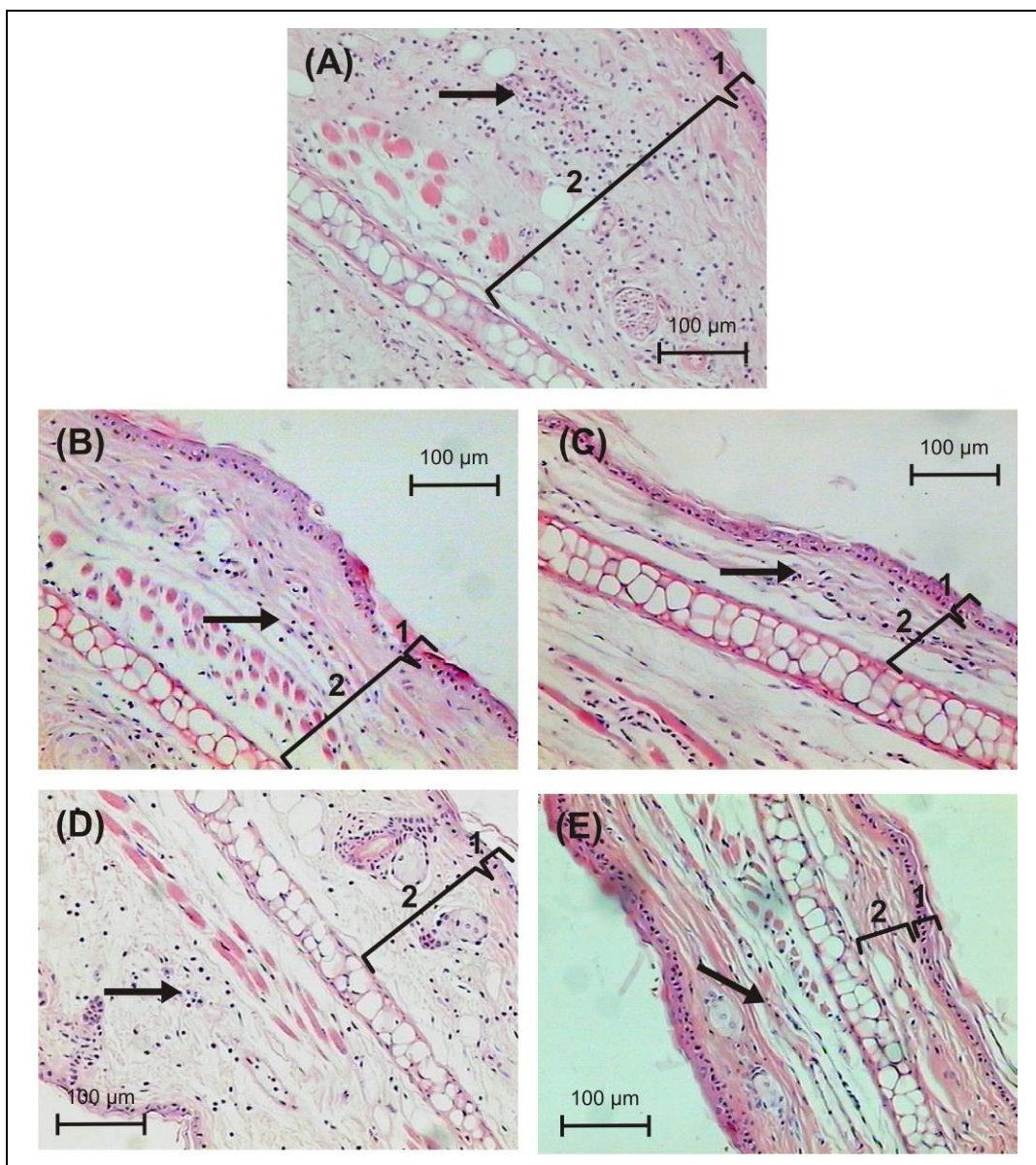


FIGURA 9. Fotomicrografia de cortes transversais de orelhas de camundongos sensibilizadas com aplicação aguda tópica de óleo de croton (6 h), coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz (aumento de 200x). As orelhas de A a D foram sensibilizadas com óleo de croton 5% (v/v) em acetona; (A) orelha tratada com veículo (Tween 80 2%), (B) indometacina, (C) dexametasona, (D) OFCC bruto. A orelha E (não inflamada) recebeu somente veículo acetona. O número 1 aponta a epiderme e o número 2 a derme. As setas indicam células inflamatórias (neutrófilos polimorfonucleares) na derme. As secções mostradas são representativas de seis animais por grupo.

4.3.2 Associação do OFCC com indometacina no edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton

A figura 10 demonstra que o OFCC em baixa concentração e associado à indometacina em baixa concentração demonstrou efeito antiedematogênico significativo comparado ao grupo controle tratado com veículo, com inibição de 47,0%, sugerindo participação dos constituintes do OFCC sobre a inibição da síntese de prostaglandinas. O OFCC e a indometacina em baixas concentrações e testadas isoladamente não demonstraram redução de edema significativa.

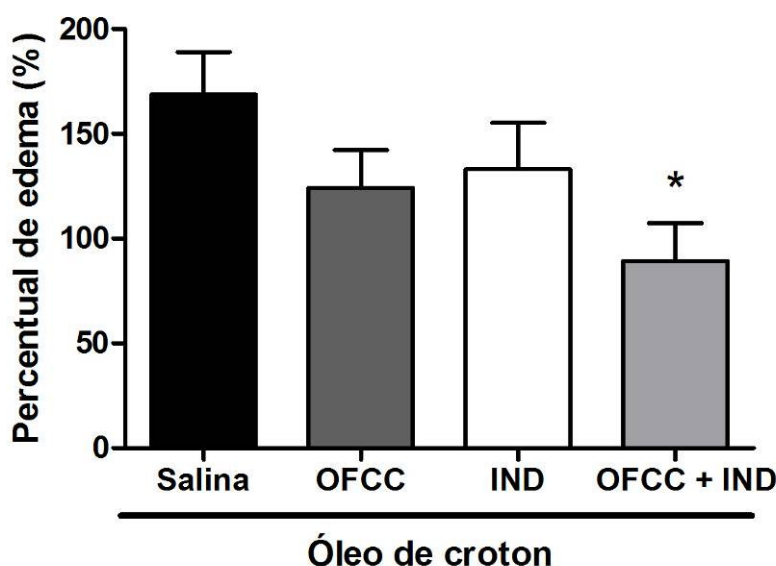


FIGURA 10. Potencialização do OFCC no efeito tópico da indometacina sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de croton (OC) em camundongos Swiss. Os animais foram pré-tratados com salina (controle negativo), indometacina (IND) 1mg/orelha, OFCC 4 mg/orelha e associação OFCC 4 mg/orelha + IND 1 mg/orelha. Após 15 minutos, receberam topicamente solução de óleo de croton 5% (v/v) em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 6 horas de aplicação do óleo de croton. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (* $P < 0,05$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls).

4.3.3 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton

A aplicação do OFCC bruto (20 μ L = 13 mg/orelha, 2 vezes ao dia, 4 dias) após 96 horas do início do ensaio e em um processo inflamatório já estabelecido, demonstrou redução significativa, comparado ao grupo controle (20 μ L/orelha, no mesmo período de tratamento do OFCC) após 48 ($P < 0,001$), 72 ($P < 0,01$) e 96 horas ($P < 0,001$) do início do tratamento (correspondendo aos tempos 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação de óleo de croton). A dexametasona (0,1 mg/orelha, mesmo período de tratamento do OFCC) foi efetiva em reduzir significativamente o edema estabelecido após 24, 48, 72 e 96 horas ($P < 0,001$) do início do tratamento (correspondendo aos tempos 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação de óleo de croton) (Figura 11), sendo confirmado pela avaliação do PE e EIM no último dia do experimento (Figura 12).

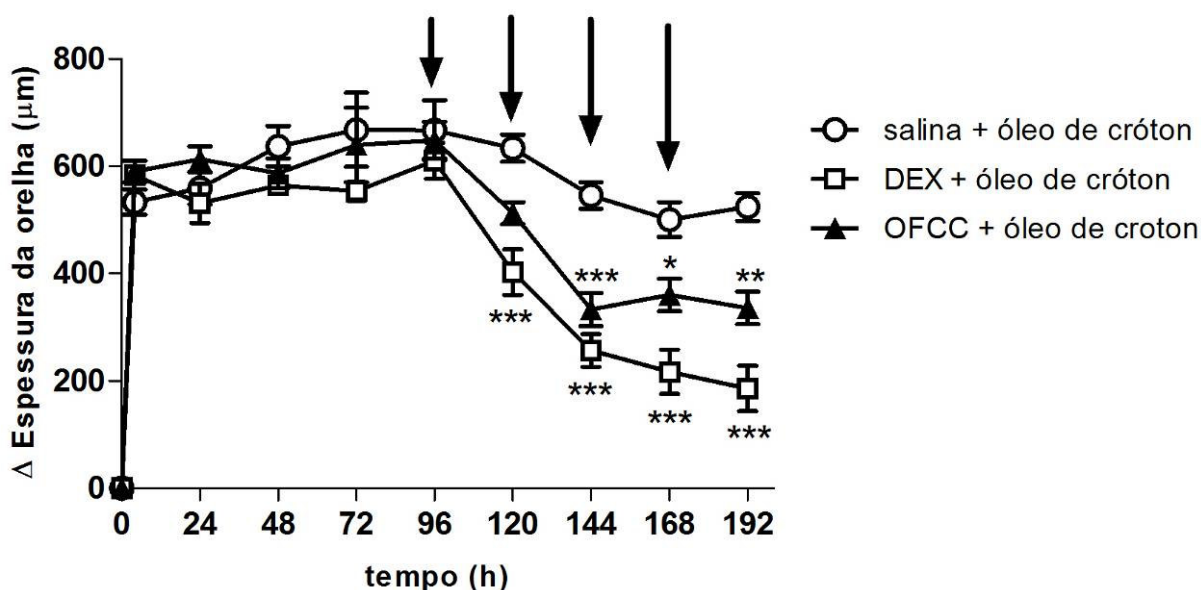


FIGURA 11. Curva tempo-resposta do efeito do OFCC sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton (OC) em camundongos *Swiss*. Os animais receberam OC em acetona na orelha direita em dias alternados e veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha desafiada com o agente flogístico foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação de OC), a orelha dos animais recebeu veículo salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou OFCC bruto (20 μ L, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 3 dias posteriores (setas apontam os dias em que houve tratamento). O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).

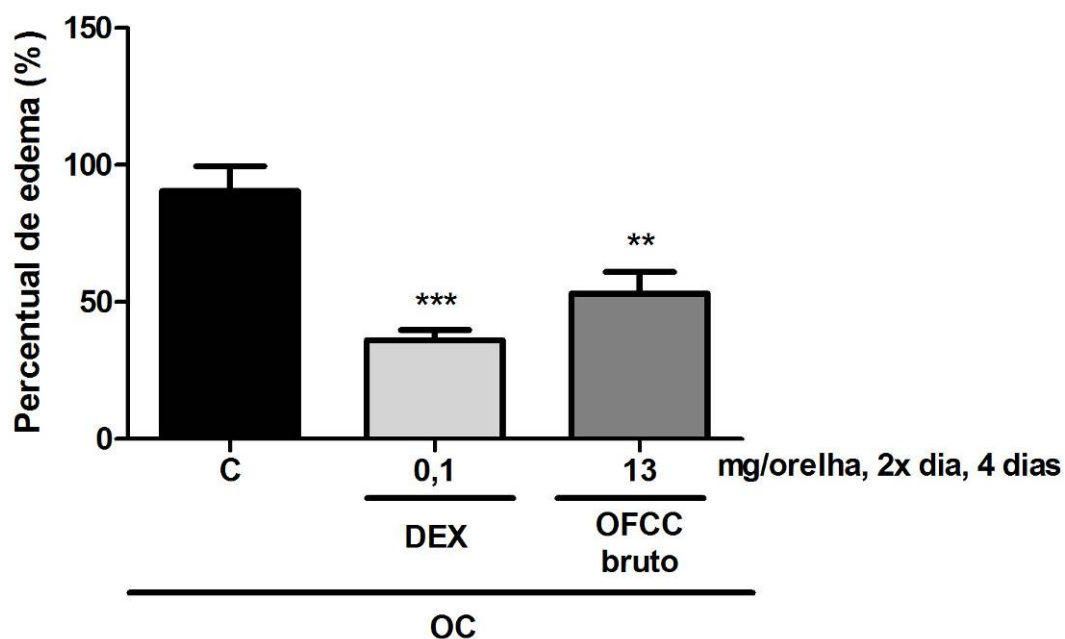


FIGURA 12. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton (OC) em camundongos *Swiss*. A aplicação de OC foi conduzida em dias alternados, durante 9 dias. No 5º, 6º, 7º e 8º dias do experimento, a orelha dos animais recebeu salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou OFCC bruto (20 µL, 2 vezes ao dia). O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 192 horas da primeira aplicação do OC. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (C) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

4.3.4 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

O OFCC bruto aplicado por via tópica (13 mg/orelha) demonstrou redução significativa no percentual de edema de orelha após 1 hora em contato com ácido araquidônico, comparada com o grupo tratado com água destilada (efeito inibitório médio de 49,7%, $P < 0,001$). A indometacina e a dexametasona, aplicadas topicamente, também demonstraram redução significativa comparada com o controle negativo, sendo que o grupo tratado com indometacina apresentou o menor percentual de edema diferindo significativamente do grupo tratado com dexametasona, com leve efeito inibitório (efeito inibitório de 70,8% *versus* 28,9%, $P < 0,05$). Não há diferenças significativas entre o grupo tratado com indometacina e dexametasona (Figura 13).

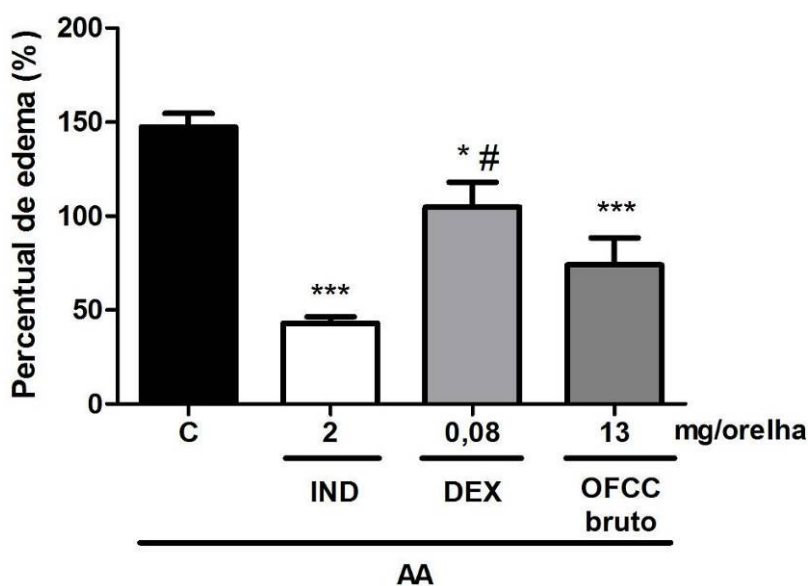


FIGURA 13. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) em camundongos Swiss. Os animais foram pré-tratados com salina, indometacina (IND), dexametasona (DEX) e OFCC concentrado (12,5 mg/orelha). Após 15 minutos, receberam topicamente ácido araquidônico (AA) 0,1 µg/mL em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 1 hora de aplicação do AA. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (C) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo; # $P < 0,01$ comparadas ao grupo tratado com indometacina. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls).

Ao analisar os cortes histológicos das orelhas submetidas à aplicação de AA, verificou-se que a orelha sensibilizada com AA tratada com salina (Figura 14-A) apresentou significativo aumento da espessura da derme e de infiltrados de células inflamatórias, comparados à orelha não inflamada (veículo acetona, Figura 14-E). As orelhas tratadas com dexametasona (Figura 14-C) demonstraram leve redução no infiltrado de células inflamatórias, enquanto que o tratamento com indometacina (Figura 14-B) e OFCC (Figura 14-D) demonstrou menor espessura da derme e redução significativa no infiltrado de células inflamatórias comparadas à orelha que recebeu AA e salina (Figura 14).

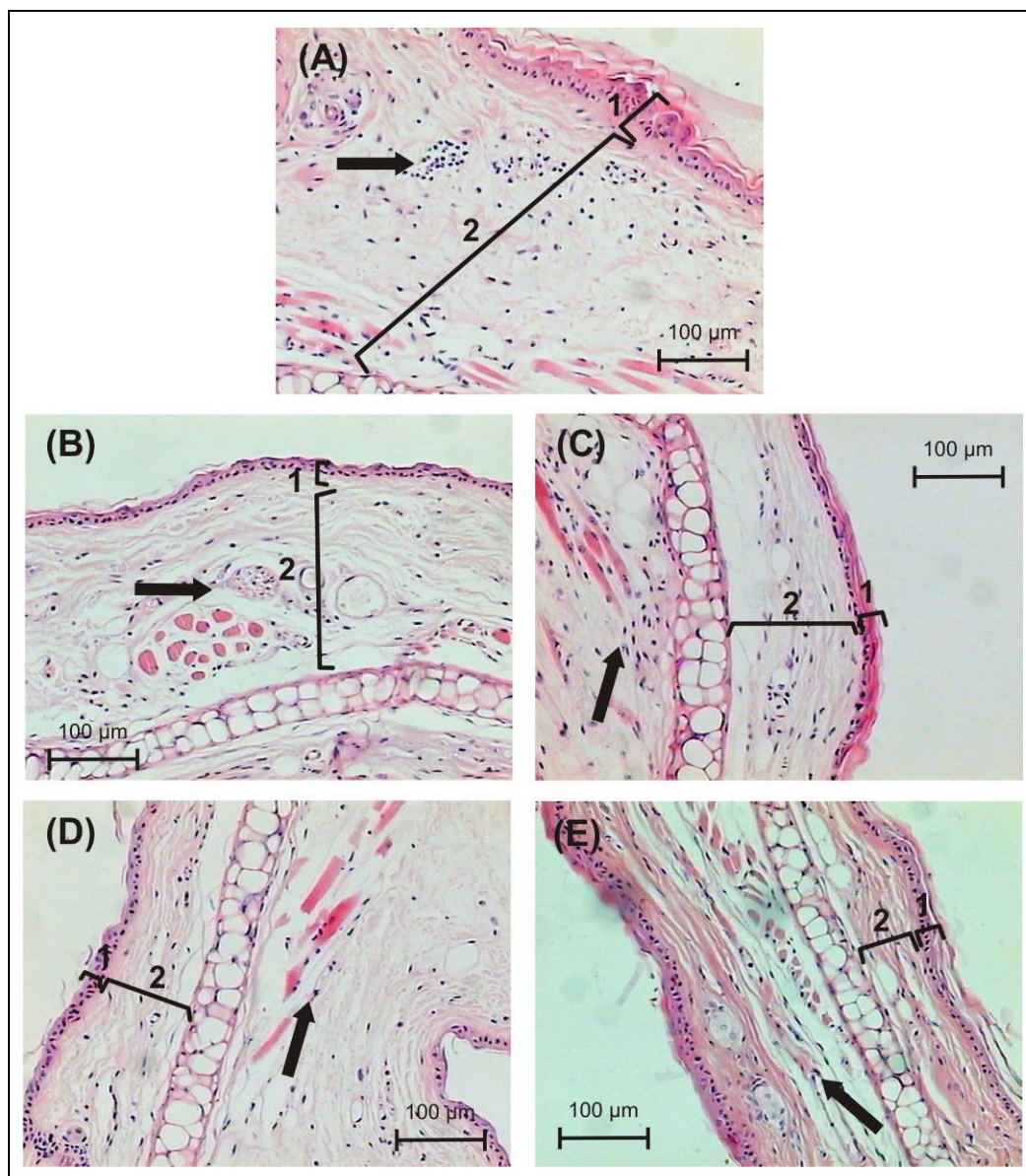


FIGURA 14. Fotomicrografia de cortes transversais de orelhas de camundongos sensibilizadas com aplicação tópica de AA (1 h), coradas com hematoxilina-eosina e analisadas em microscopia de luz (aumento de 200x). As orelhas de A a D foram sensibilizadas com AA 0,1 mg/µL em acetona; (A) orelha tratada com salina, (B) indometacina, (C) dexametasona, (D) OFCC bruto. A orelha E (não inflamada) recebeu somente veículo acetona. O número 1 aponta a epiderme e o número 2 a derme. As setas indicam células inflamatórias (neutrófilos polimorfonucleares) na derme. As secções mostradas são representativas de seis animais por grupo.

4.3.5 Edema de orelha induzido por capsaicina

O OFCC bruto aplicado por via tópica (13 mg/orelha) não demonstrou redução significativa no percentual de edema de orelha após 30 minutos da aplicação tópica de capsaicina, comparada com o grupo tratado com água destilada (controle negativo). Somente o grupo tratado com dexametasona demonstrou redução significativa comparada com o controle negativo, com efeito inibitório médio da inflamação de 58,5 % ($P < 0,01$) (Figura 15).

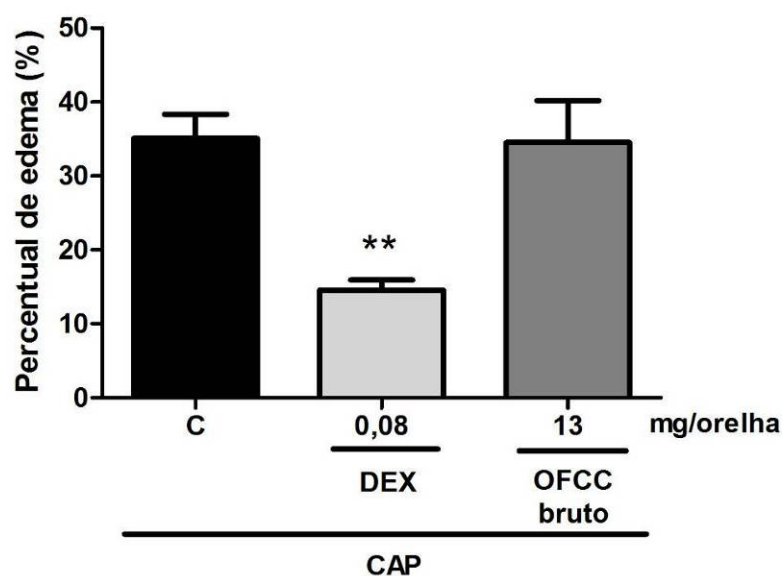


FIGURA 15. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido por capsaicina em camundongos Swiss. Os animais foram pré-tratados com salina (controle negativo), dexametasona (DEX) 0,08 mg/orelha e OFCC bruto (13 mg/orelha). Após 15 minutos, receberam topicamente capsaicina 0,01 $\mu\text{g/mL}$ em etanol 90%. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 30 minutos de aplicação da capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (salina) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (** $P < 0,01$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls).

4.3.6 Edema de orelha induzido por histamina

O OFCC bruto aplicado por via tópica (13 mg/orelha), apesar de discreta redução no percentual de redução do edema de orelha (efeito inibitório de 13,8%) após 2 horas da aplicação intradérmica de solução de histamina, não foi significativo comparado ao grupo controle tratado com salina. A dexametasona inibiu o edema ($P < 0,05$), com efeito inibitório médio de 65,7% (Figura 16).

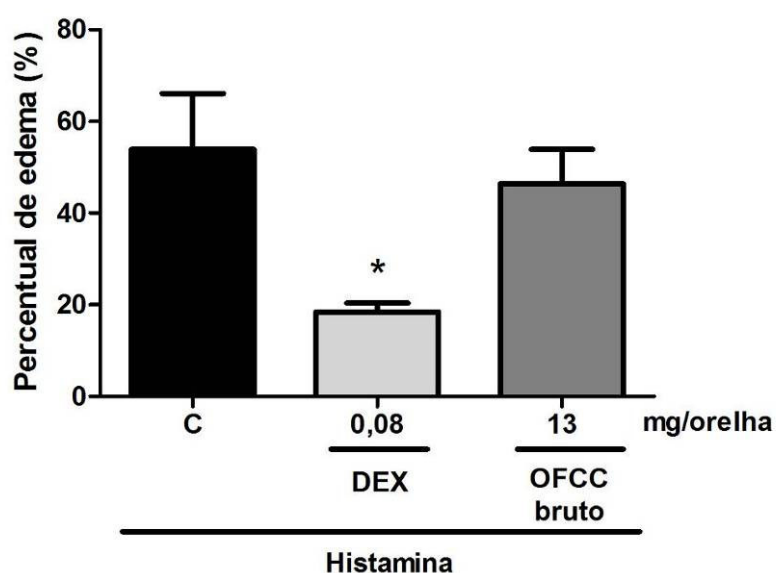


FIGURA 16. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido pela aplicação intradérmica de histamina em camundongos *Swiss*. Os animais, previamente anestesiados, foram pré-tratados com salina (C), dexametasona (DEX) e OFCC concentrado. Após 15 minutos, receberam intradérmicamente na orelha direita uma injeção de 5 μ L de solução de histamina 100 mg/mL. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 2 horas de aplicação da histamina. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (C) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (* $P < 0,05$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

4.3.7 Edema de orelha induzido por fenol

O OFCC bruto aplicado por via tópica (13 mg/orelha) demonstrou redução significativa no percentual de edema de orelha após 1 hora da aplicação tópica de fenol 10% em acetona, comparada com o grupo tratado com salina (controle negativo), com efeito inibitório médio de 38,8% ($P < 0,001$). O grupo tratado com dexametasona também demonstrou redução significativa (EIM de 29,5%, $P < 0,01$) comparada com o controle negativo (Figura 17).

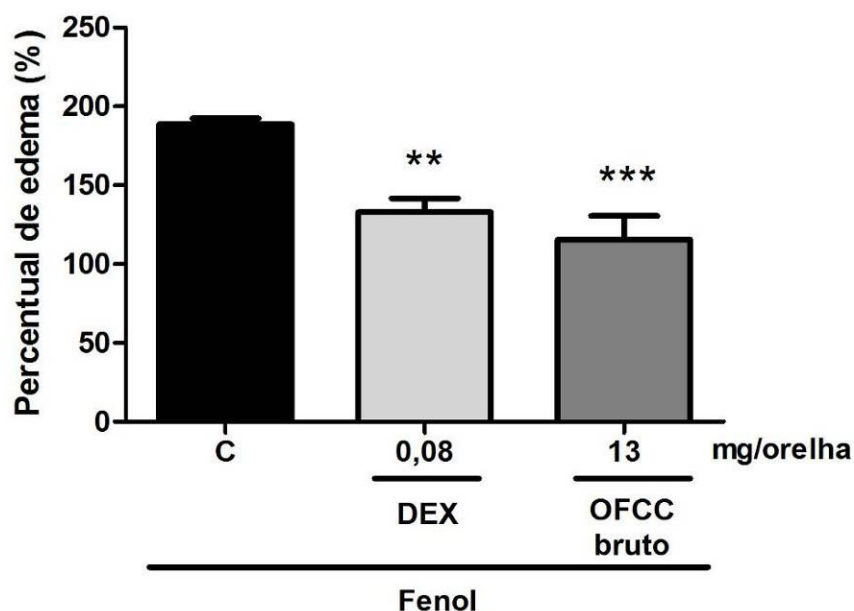


FIGURA 17. Efeito tópico do OFCC sobre o edema de orelha induzido por fenol em camundongos Swiss. Os animais foram pré-tratados com salina, dexametasona (DEX) e OFCC concentrado. Após 15 minutos, receberam topicamente 20 μ L de fenol 10% (v/v) em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 1 hora de aplicação do fenol. Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (salina) e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Análise estatística: ANOVA seguida do teste de Student-Newman-Keuls).

4.4 Efeito do OFCC no edema de pata induzido por carragenina – tratamento agudo por via oral

O tratamento agudo por via oral do OFCC em 2% de Tween 80 nas concentrações de 200 e 400 mg/kg, comparado ao controle negativo (tratamento com salina em Tween 80 2%), não demonstrou diferença estatística significativa em nenhum horário de avaliação (1 a 4 horas após indução do edema), apesar de que é possível perceber uma tendência de redução pela dose de 400 mg/kg (com melhor efeito), mas não estatisticamente significante ($P > 0,05$). O controle positivo (indometacina 10 mg/kg, v.o.) demonstrou redução significativa no volume do edema comparado ao controle negativo nos tempos 2 ($0,17 \pm 0,04$ mL *versus* $0,34 \pm 0,03$ mL, $P < 0,01$), 3 ($0,22 \pm 0,04$ mL *versus* $0,49 \pm 0,03$ mL, $P < 0,001$) e 4 horas ($0,20 \pm 0,04$ mL *versus* $0,54 \pm 0,03$ mL, $P < 0,001$) após indução do edema pelo agente flogístico (Figura 15).

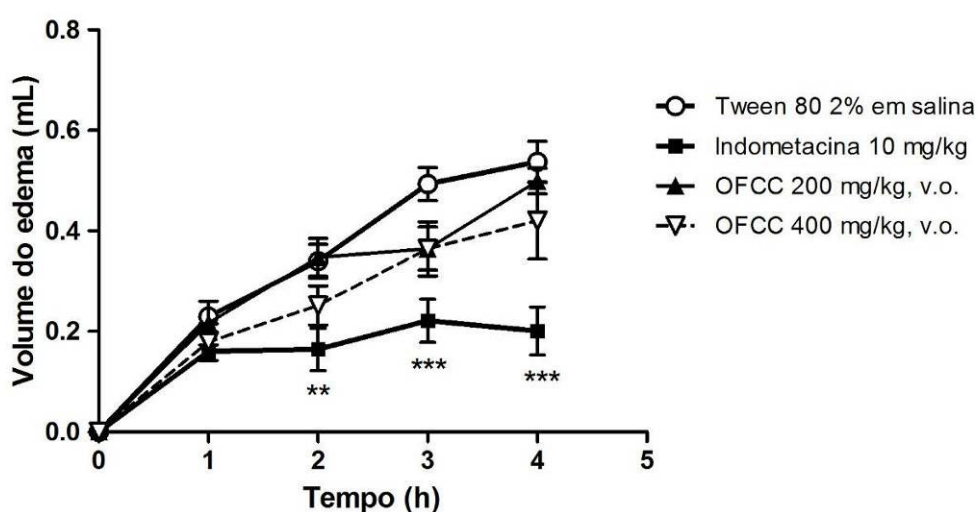


FIGURA 18. Curva tempo-resposta do efeito do OFCC (tratamento por via oral) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*. Os animais foram pré-tratados com veículo salina em Tween 80 2% (controle negativo), indometacina ou OFCC nas doses 200 e 400 mg/kg e após 1 hora, receberam a administração intraplantar de carragenina. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação do volume da pata medido através do hidropletismógrafo nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da carragenina. Os pontos representam a média de 6 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os poucos dados etnofarmacológicos relatam a utilização do óleo de pequi, por comunidades do interior do Nordeste brasileiro, no tratamento de gripes, afecções da garganta, contusões, inchaços, inflamações cutâneas, ferimentos, reumatismo e dores musculares (BRAGA, 1960; OLIVEIRA *et al.*, 2007), sendo que tais doenças representam processos patológicos de origem inflamatória. Segundo Matos (2003), a aplicação secular e a constatação popular da eficácia de um produto natural já demonstram sua relevância como um importante fitoterápico. No entanto, observa-se que os estudos acerca do possível potencial farmacológico do óleo desta espécie de pequi são escassos, não sendo encontrados na literatura especializada indexada, até o momento deste estudo, nenhum registro que aborde o potencial anti-inflamatório do óleo da polpa de *C. coriaceum*.

O emprego de produtos naturais na medicina popular para o tratamento de inflamações sugere que tais substâncias possam ter princípios ativos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos com esse objetivo.

A extração do óleo da polpa de *C. coriaceum* (OFCC) se procedeu pelo método de extração a quente com arraste dos constituintes por solvente orgânico (acetato de etila) em extrator de Soxhlet, amplamente utilizado em laboratório para a obtenção de óleos fixos. O óleo obtido pelas comunidades tradicionais de forma artesanal ocorre por intensa fervura de muitos frutos de pequi sem a casca e mesocarpo externo (polpa com caroço), por um período de muitas horas (FIGUEIREDO *et al.*, 1989). Durante esse processo de fervura, o óleo se desprende da polpa dos frutos e, devido a sua baixa densidade e sua imiscibilidade a água, ocorre a formação de um sobrenadante, constituindo o óleo. Lima (1980) e Figueiredo *et al.*, (1989), ao compararem o óleo fixo da polpa de *C. coriaceum* obtido por extração artesanal e com extrator de Soxhlet, constataram não haver diferenças significativas entre constantes físicas, químicas e o percentual de ácidos graxos presentes em ambos os óleos. O método de extração laboratorial foi adotado nesse estudo por demonstrar maior rendimento comparado ao método artesanal (usando um número menor de frutos) e por ser um procedimento mais rápido de obtenção de óleo fixo.

A análise de uma amostra do OFCC através de CG/EM revelou a presença de ácidos graxos saturados e insaturados (dados fornecidos na tabela 2), além de que dados da literatura também confirmam a presença de compostos carotenoides (FIGUEIREDO *et al.*, 1989). Essas substâncias sugerem que o OFCC tenha potencial antioxidante (HENRY *et al.*, 2002; BARREIROS *et al.*, 2006).

As espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS) são produzidas, essencialmente, durante a fosforilação oxidativa e por ativação de células fagocíticas durante uma explosão oxidativa. A produção excessiva de ROS e a peroxidação lipídica podem levar ao dano em lipídios, proteínas, membranas e ácidos nucleicos e também serve como um importante sinalizador intracelular que amplifica respostas inflamatórias. Inúmeros estudos demonstram o envolvimento de ROS nos processos inflamatórios, como na patogênese das artropatias crônicas inflamatórias, como a artrite reumatoide. Acredita-se que as ROS possam atuar como segundos mensageiros para ativação do fator de transcrição NF- κ B, que orquestra a expressão de vários genes que perpetuam a resposta inflamatória (SURH, 2005; FILIPPIN *et al.*, 2008).

Moléculas bioativas, tais como tocoferóis e carotenoides, entre outras, têm por função impedir o ataque de ROS ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais, contribuindo para reduzir câncer, doenças do coração e outros problemas degenerativos associados ao envelhecimento que pode ser causado pela presença de radicais livres (BARREIROS *et al.*, 2006).

Henry *et al.* (2002), ao testar a atividade antioxidante de vários ácidos graxos através da análise do modelo de oxidação lipossômica usando espectroscopia de fluorescência, constatou que os ácidos palmítico, palmitoleico, linoleico, oleico, e cis-11-eicosenoico (todos presentes no OFCC, ver tabela 2) demonstraram efeito antioxidante na concentração de 60 ppm, comparados ao efeito antioxidante do BHA (hidroxianisolbutilado, 1,8 ppm), BHT (hidroxitolueno-butilado, 2,2 ppm) e TBHQ (terc-butil-hidroxiquinona, 1,66 ppm). Dos constituintes do OFCC testados isoladamente, somente o ácido esteárico não demonstrou atividade antioxidante.

A radiação UV é responsável por numerosos danos à pele como, por exemplo, o eritema calórico, a queimadura solar, o fotoenvelhecimento, a fotossensibilidade e o câncer de pele. A fotossensibilidade pode gerar reações fototóxicas e fotoalérgicas, que ocorrem quando substâncias químicas são transformadas em metabólitos tóxicos através da biotransformação enzimática

causada pela ação da radiação UV (SANTOS *et al*, 2001). As reações fototóxicas desencadeiam eritemas, edemas, esfoliações e hiperpigmentação na pele, decorrentes de exposição á radiações solares e radiações de comprimento de onda entre 200 e 400 nm. Já as reações fotoalérgicas envolvem uma ativação do sistema imune por promoção de reações entre as substâncias alergênicas e as proteínas da pele em meio à luz solar, gerando uma resposta imunológica e posterior produção de anticorpos específicos (RAMOS *et al*, 2005). Substâncias como o 8-MOP desencadeia atividade fotossensibilizante em micro-organismos (pela inibição das colônias) e na pele (pela produção de eritema, esfoliação e hiperpigmentação) devido a geração de substâncias fototóxicas quando expostas à radiação UVA. O OFCC não apresentou atividade fotossensibilizante, comprovando que o uso tópico não oferece esse tipo de risco para aplicação tópica mesmo sob exposição solar.

A atividade fotossensibilizante de uma substância pode ser testada tanto por métodos *in vitro* (ensaio de fototoxicidade microbiológica) como *in vivo* (fotossensibilização de substância aplicada no dorso de roedores após exposição à radiação UVA). Segundo Ramos *et al.* (2005), em ambos os ensaios são verificadas os mesmos resultados quanto à fototoxicidade. Optou-se por testar o ensaio de fototoxicidade microbiológica porque, além de ser uma alternativa à utilização de animais, ainda pode-se detectar a existência de atividade antimicrobiana da substância em estudo (o que não foi observado atividade antimicrobiana do OFCC contra as cepas analisadas).

O potencial anti-inflamatório tópico do OFCC foi verificado com a aplicação do modelo de edema de orelha induzido por vários agentes irritantes (GÁBOR, 2000). Esses testes objetivam verificar o potencial antiedematogênico de substâncias aplicadas por via tópica. Além de apontar possíveis propriedades terapêuticas de substâncias no tratamento de inflamações cutâneas agudas, esses modelos também fornecem indícios de propriedades importantes, como a absorção e a possível ação local da substância em estudo, devido a sua aplicação direta no foco inflamatório (VANE, 2000). Justifica-se a utilização de diferentes agentes irritantes (óleo de croton, capsaicina, AA, fenol) devido ao seu mecanismo de ação edematogênica distintos, simulando afecções cutâneas características ou sugerindo o possível mecanismo de ação antiedematogênica da substância em estudo (BLAZSÓ & GÁBOR, 1995).

O óleo de croton, extraído da planta *Croton tiglium*, tem como princípios irritantes ésteres de forbol, destacando-se como majoritário o 13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol (TPA, do inglês *12-o-tetracanoilphorbol-13-acetate*) (LAPA, 2003). Estudos afirmam que a inflamação aguda induzida pela aplicação tópica de TPA ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, resultando em migração de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), liberação de histamina e serotonina e moderada síntese de eicosanoides (6-ceto-PGF_{1α}, PGE₂ e LTB₄) (PUNGERÓ *et al.*, 1998; BADILLA *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual o TPA exerce seu efeito é decorrente da ativação da proteína quinase C (PKC), que por sua vez ativa outros grupos enzimáticos, como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a PLA₂, que induz a liberação de PAF e AA que, conseqüentemente, desencadeia a produção de eicosanoides inflamatórios via enzimas COX e LOX (FERRANDIZ *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2001; MURAKAWA *et al.*, 2006). O TPA também parece induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos da pele, desencadeando o processo inflamatório (WILMER *et al.*, 1994; REDONDO *et al.*, 1997). Trabalhos recentes ainda apontam que o TPA também ativa vias de sinalização intracelulares dependentes da enzima óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), que tem um papel fundamental no controle da resposta inflamatória na pele pela produção de NO (MEDEIROS *et al.*, 2009).

O edema de orelha induzido por óleo de croton é um modelo bem estabelecido para a investigação dos efeitos de compostos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (TOWBIN *et al.*, 1995). Fármacos inibidores das COX e 5-LOX, antagonistas de LTB₄, inibidores seletivos de iNOS e corticoesteroides podem demonstrar ação anti-inflamatória tópica, com redução significativa do edema em modelos animais de inflamação cutânea induzido por óleo de croton ou TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006; MEDEIROS *et al.*, 2009). No entanto, ao comparar o efeito antiedematogênico de anti-inflamatórios esteroidais (ou corticoesteroides, como a dexametasona) e não-esteroidais (AINE, como a indometacina), percebe-se que corticoesteroides tem potencial antiedematogênico maior que os AINE (BADILLA *et al.*, 2007). Isso se justifica devido aos mecanismos distintos: os corticoesteroides inibem a PLA₂, interferindo na liberação de AA e liso-PAF (precursor do PAF); impedem a produção, por múltiplas células, de fatores que são críticos na geração da resposta inflamatória; ocorrendo assim liberação diminuída de fatores vasoativos e quimiotáticos; secreção diminuída de enzimas disponíveis para

síntese de intermediários de prostaglandinas; extravasamento diminuído de leucócitos e fibrose diminuída. Os AINE não afetam a mobilização de neutrófilos, mas impedem a síntese de intermediários de prostaglandinas via inibição das enzimas COX-1 e COX-2 (mediadores tardios), contribuindo assim para uma diminuição do edema (RANG *et al.*, 2007; STRUEBE, 1997). Tal situação foi constatada na quantificação do percentual de edema (Figura 8) e na análise histopatológica (Figura 9), tendo em vista que a dexametasona teve redução maior do edema comparada à indometacina (Figura 8).

Pode-se constatar na figura 8 que o OFCC demonstrou redução somente nas concentrações mais elevadas de 8 mg/orelha e óleo bruto (13 mg/orelha). O efeito não diferiu significativamente do efeito da indometacina, sugerindo uma ação inibitória de mediadores tardios (STRUEBE, 1997). A observação dos cortes histológicos das orelhas tratadas com OFCC bruto também apresenta aspectos semelhantes às orelhas tratadas com a indometacina (Figura 9). Com base nessas observações, objetivou-se verificar se o OFCC em concentração menor (4 mg/orelha) é capaz de potencializar o efeito da indometacina (um inibidor da síntese de prostaglandinas), também em concentração menor, no modelo agudo de edema de orelha induzido por óleo de croton. De acordo com a figura 10, a associação das duas substâncias demonstrou redução significativa de 47,0%, o que sugere a participação do OFCC na inibição da síntese de prostaglandinas.

Os dados da curva de concentração-resposta (figura 8) sugerem que a disponibilidade dos ácidos graxos presentes no OFCC apresentam atividade anti-inflamatória tópica satisfatória somente em concentrações acima de 8 mg. Quirino (2009), ao investigar o efeito cicatrizante do OFCC, constatou eficácia do óleo bruto na aplicação local. Diante dessas observações, escolheu-se o OFCC bruto para a investigação dos demais mecanismos nos demais modelos, objetivando também minimizar o número de animais utilizados.

Enquanto que uma aplicação única de óleo de croton fornece dados quanto à atividade antiedematogênica de uma substância num processo inflamatório agudo, a aplicação múltipla de óleo de croton, em dias alternados, avalia a atividade antiedematogênica num processo inflamatório já estabelecido, com características semelhantes a uma inflamação crônica. A aplicação múltipla de óleo de croton promove uma reação inflamatória persistente acompanhada do aumento da massa das orelhas, intensa migração de neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (CD₄₊ e CD₈₊)

e hiperproliferação epidérmica (acantose), demonstrando características encontradas em algumas doenças inflamatórias crônicas da pele (STANLEY *et al.*, 1991). Corticoesteroides e inibidores da LOX demonstram atividade nesse modelo, enquanto que os inibidores da COX e anti-histamínicos demonstram pouco ou nenhum efeito (GREEN & SHUSTER, 1987). Por isso, esse modelo demonstra ação de fármacos que influenciam a liberação de leucotrienos (STANLEY *et al.*, 1991). O OFCC foi capaz de inibir significativamente o efeito antiedematogênico da aplicação múltipla de óleo de croton na orelha de camundongos após 48 horas do início do tratamento (figura 11).

Uma das características que os óleos vegetais, ricos em ácidos graxos normalmente apresentam, é uma composição semelhante aos lipídios encontrados na pele humana. O óleo vegetal, quando aplicado na pele, não forma película contínua devido a sua tensão superficial e imiscibilidade com água, dispendo-se em gotículas nos espaços interfoliculares e entre os poros sudoríparos. Apesar de haver diferentes meios de permeação percutânea (absorção), como por exemplo, por difusão através das células – penetração transcelular (através dos corneócitos e matriz lipídica intercelular), por difusão entre as células – penetração intercelular (por entre os corneócitos e pela matriz lipídica) ou por difusão através dos folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas, e anexos pilosebáceos – penetração transanexal (ALLEN-JÚNIOR *et al.*, 2007) pode-se confirmar, com base nos dados dos tratamentos agudos e crônicos, que a baixa biodisponibilidade local deve-se provavelmente pela dificuldade de permeação cutânea. O ácido linoleico (presente no OFCC) tem sido relatado em vários trabalhos como importante na regulação das funções na barreira da pele (FORSLIND *et al.*, 1997).

Segundo Crummey e colaboradores (1987), Young e colaboradores (1984) e Pungero e colaboradores (1998), a aplicação local de AA estimula uma resposta inflamatória rápida (comparada ao modelo induzido por óleo de croton), sendo possível observar vasodilatação imediata e eritema nos 5 primeiros minutos, seguida por desenvolvimento de edema após 40-60 minutos e até 1 hora, coincidindo com extravasamento de proteínas e leucócitos. O AA é o precursor de eicosanoides inflamatórios, tais como a PGE₂, LTB₄, LTC₄ e LTD₄ (via produção pelas enzimas COX-1, COX-2 e 5-LOX) que induzem a vasodilatação, quimiotaxia (principalmente pelos leucotrienos), aderência leucocitária, agregação plaquetária, edema, dor e febre (IVERSEN & KRAGBALLE, 2000; MARCHIONNI *et al.*, 2006). A literatura

relata que inibidores da COX e LOX demonstram redução significativa no percentual de edema induzido por AA, enquanto que corticoesteroides demonstram menor redução do edema ou nenhum efeito, comparada aos AINE's (CARLSON *et al*, 1985; GÁBOR, 2000; BADILLA *et al*, 2007). Vale ressaltar que há metabólitos do AA também responsáveis por degranulação dos mastócitos, liberando histamina: isso significa afirmar que o modelo de edema induzido por AA não é específico para identificar compostos que inibem exclusivamente a COX ou LOX, pois antagonistas da histamina e antioxidantes também são capazes de reduzir o edema induzido por AA (YOUNG *et al*, 1984; CRUMMEY, 1987; BLASZÓ & GÁBOR, 1995).

Observamos na figura 13 que o OFCC bruto reduziu significativamente o edema de orelha induzido por AA, demonstrando um percentual de edema menor do que o grupo tratado com a dexametasona. A análise histológica das orelhas sensibilizadas com AA e tratadas com OFCC (figura 14) revelou pouco infiltrado de células inflamatórias, semelhante ao observado nas orelhas tratadas com indometacina. A dexametasona, como era de se esperar, tem maior quantidade de infiltrado de células inflamatórias nesse modelo (GÁBOR, 2000). Os dados sustentam que substâncias do OFCC podem influenciar na produção de eicosanoides inflamatórios, que impediriam a quimiotaxia de células inflamatórias ou aumento de permeabilidade vascular. A indometacina foi capaz de demonstrar o menor edema, porém ela não impede que sejam produzidos leucotrienos, já que ela é inibidora apenas de COX-1 e COX-2 (tendo mais seletividade para COX-1) (RANG *et al*, 2007).

A capsaicina (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida) é um alcaloide irritante presente em plantas do gênero *Capsicum* (pimentas) e é responsável pelo sabor picante dos frutos dessas espécies. Quando em contato com a pele, a capsaicina exerce efeito imediato sobre um alvo específico, os receptores vaniloides TRPV1, também localizados em fibras aferentes primárias do tipo C e parte das fibras do tipo A δ , que produz resposta rápida através da liberação de neuropeptídeos, como o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), taquicininas e as monoaminas como a histamina e a serotonina (via ativação de receptores 5-HT₂) (GÁBOR & RAZGA, 1992; INOUE *et al*, 1993; INOUE *et al*, 1995), que aumentam a resposta inflamatória neurogênica imediata, caracterizada por vasodilatação das arteríolas, aumento do fluxo sanguíneo e conseqüente extravasamento plasmático e sensibilização a dor (GÁBOR, 2000).

As pesquisas apontam que os fármacos inibidores de metabólitos do ácido araquidônico não apresentam redução no edema de orelha induzido por capsaicina, enquanto que a dexametasona, antagonistas da histamina e da substância P são efetivos inibidores do edema induzido por capsaicina. Além do mais, bloqueadores dos canais de Ca^{2+} e o vermelho de rutênio (um inibidor da capsaicina) também demonstram ação antiedematogênica no modelo induzido por capsaicina, mas não no modelo induzido por AA (INOUE *et al.*, 1993). Antagonistas do receptor de bradicinina BK_1 também reduzem o edema de orelha induzido por capsaicina (MANTIONE & RODRIGUES, 1990).

O OFCC não demonstrou redução significativa do edema de orelha induzido por capsaicina ($P > 0,05$), sugerindo não influenciar nas vias inflamatórias ativadas pela capsaicina, como a ativação dos receptores vaniloides ou da própria capsaicina (Figura 15).

A histamina é uma amina vasoativa liberada por mastócitos ativados pelas proteínas do complemento C3a e C5a e por leucócitos ativados por IgE, sendo responsável pelo aumento da permeabilidade vascular e tem ação vasodilatadora (RANG *et al.*, 2007; KINDT *et al.*, 2008). A histamina, por sua ação rápida, também está envolvida nas reações de hipersensibilidade do tipo imediata (BRAND *et al.*, 2002). Anti-histamínicos e corticoesteroides apresentam redução do edema nesse modelo, o que se confirma com a redução do edema no grupo tratado com dexametasona (Figura 16).

De acordo com a figura 16, o OFCC bruto não foi capaz de demonstrar redução significativa do edema induzido por histamina, comparada ao controle negativo salina ($P > 0,05$). Este dado sugere não haver envolvimento do OFCC em vias relacionadas com a histamina, acreditando-se não haver envolvimento do óleo na inibição de histamina produzida na ação edematogênica induzida por AA, e sim na influência da produção de eicosanoides inflamatórios. Essa hipótese ainda é sustentada com o dado de potencialização do efeito da indometacina associada ao OFCC.

O edema de orelha induzido por fenol é um bom modelo para simular uma dermatite de contato. Quando há o contato do fenol com a pele, os queratinócitos produzem mediadores químicos importantes na irritação primária de contato, incluindo citocinas associadas a propriedades pró-inflamatórias, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8 (LIM *et al.*, 2004). Essas citocinas pró-inflamatórias são produzidas por

um mecanismo diferente das vias dependentes da PKC (como ocorre na inflamação induzida por óleo de croton). É provável que a irritação cutânea seja desencadeada pela ruptura da membrana plasmática dos queratinócitos, que resulta na liberação da IL-1 α pré-formada e de outros mediadores inflamatórios como os metabólitos do AA e de ROS, estes últimos também formados devido ao estresse oxidativo (WILMER *et al*, 1994; MURRAY *et al.*, 2007).

O OFCC bruto reduziu de maneira significativa o edema induzido por fenol (Figura 17) quando comparado com o grupo controle. Essa atividade pode estar relacionada com a influência na produção de metabólitos do AA e com sua atividade antioxidante, por possuir ácidos graxos com tal atividade (HENRY *et al*, 2002). Esse dado também sugere a possível utilização do OFCC em dermatites de contato irritativas.

De acordo com os modelos de edema de orelha induzidos por óleo de croton, AA, capsaicina e fenol, observa-se que o OFCC demonstra comportamento semelhante a fármacos que reduzem a produção de metabólitos do AA. Sugere-se, portanto, que a ação anti-edematogênica do OFCC esteja ligado a fatores que modifiquem a produção de eicosanoides inflamatórios, podendo sua ação estar relacionada com a inibição das enzimas COX e LOX ou com a produção de eicosanoides anti-inflamatórios (PGE₁, lipoxinas ou outros).

Na literatura, alguns trabalhos têm destacado o efeito dos ácidos graxos encontrados no OFCC sobre eventos relacionados a processos inflamatórios. Höhlfeld e colaboradores (2008) demonstraram que os ácidos oleico (AO) e palmítico (AP) inibiram moderadamente a agregação plaquetária induzida por AA (75 \pm 7 e 43 \pm 18% do controle, respectivamente, com P < 0,05), com pequena inibição da formação de tromboxanos. Henry e colaboradores (2002) observaram que o ácido oleico, na concentração de 100 ppm, demonstrou atividade inibitória moderada para a COX-1 em torno de 25%. A partir do conhecimento dos ácidos graxos presentes no OFCC (Tabela 1), pode-se sugerir que o AO e o AP, componentes majoritários do OFCC, podem ser em parte relacionados à diminuição da atividade inflamatória tópica.

O ácido linoleico (AL), um n-6 poli-insaturado e também presente no OFCC, tem sido apontado na literatura como pró-inflamatório e anti-inflamatório. O efeito pró-inflamatório é apontado por ser precursor do AA via enzima Δ 6-desaturase. Por outro lado, o efeito anti-inflamatório se justifica pelas seguintes razões: (1) o AL é

precursor do ácido 13-hidroxi-octadecaenoico (13-HODE) via 15-LOX, substância que inibe a produção de superóxidos, reduz a migração de leucócitos PMN através do endotélio ativado por citocinas, promove vasodilatação na artéria aorta e modula as ações de leucotrienos e prostanoídes (FRITSCHÉ, 2008); (2) os trabalhos de Ringbom *et al.* (2001) e Henry *et al.* (2002) apontam o AL como inibidor da COX-1 e COX-2 *in vitro*; (3) células humanas monocíticas THP-1 *in vitro* tratadas com AL tiveram redução significativa na secreção de IL-6, IL-1 β e TNF- α , comparadas com células THP-1 tratadas com ácido palmítico ($P < 0,05$), diminuindo também a expressão do gene do TNF- α e do fator de transcrição NF- κ B (ZHAO *et al.*, 2005). Além do mais, Ziboh e colaboradores (2000) afirmam que a enzima Δ 6-desaturase é deficiente na epiderme, concluindo, portanto, que não há influência significativa do AL na produção de AA via enzima Δ 6-desaturase nesse local. O trabalho de Doherty *et al.* (1988), no intuito de verificar o potencial edematogênico de ácidos graxos isolados em orelhas de camundongos, concluiu que somente o AA demonstrou edema maior que outros ácidos graxos testados (AL, DHA, EPA). Todos esses dados sugerem a participação do AL na atividade anti-edematogênica tópica do OFCC.

Não se pode descartar também o possível envolvimento de lipoxinas, substâncias recentemente descritas que são oriundas do metabolismo do AA via 15-LOX e 5-LOX com potente atividade anti-inflamatória (LAWRENCE *et al.*, 2002; FRITSCHÉ, 2008), nem a atividade antioxidante dos constituintes presentes, que podem contribuir com a atividade anti-inflamatória via redução das ROS (conforme já fora comentado).

Em relação ao modelo de edema de pata induzida por carragenina, não se observou diferenças significativas, em nenhum dos intervalos de tempo analisados, no volume do edema dos animais tratados com OFCC solubilizado em salina em Tween 80 2% nas concentrações 200 e 400 mg/kg (v.o.), comparado com os valores do edema dos animais tratados com salina em 2% de Tween 80.

A carragenina, usada como agente flogístico no modelo de edema de pata, é uma substância que provoca vasodilatação, aumento de permeabilidade e dor. Observa-se o aumento do volume da pata já na primeira hora após a aplicação da carragenina, devido a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina) e mediadores iniciais. O pico máximo do edema num grupo não tratado com substâncias anti-inflamatórias ocorre entre 3 e 4 horas, período que coincide com o

aumento de eicosanoides pró-inflamatórios (mediadores tardios). (DI-ROSA *et al.*, 1971). Os animais tratados com corticosteroides (por exemplo, dexametasona) demonstraram redução do edema já na primeira hora de avaliação quando comparados ao grupo não-tratado; já os animais tratados com anti-inflamatórios não-esteroides (por exemplo, indometacina) demonstraram redução do edema significativa após 2 horas o que corrobora com o indício de redução de prostaglandinas e tromboxanos (mediadores tardios da inflamação) via inibição das enzimas COX e LOX (WINTER *et al.*, 1962; DI-ROSA *et al.*, 1971).

No modelo de edema de pata induzido pela aplicação intraplantar de carragenina, observou redução significativa do edema dos animais tratados com indometacina ($P < 0,001$) nos tempos 2, 3 e 4 horas após a aplicação de carragenina, comparados ao grupo tratado com salina em Tween 80 2% (Figura 18). Tal observação é esperada, pois a indometacina, quando administrada por via oral, é inibidora da COX-1 e COX-2, inibindo a síntese de prostaglandinas e tromboxanos e, conseqüentemente, contribuindo para a redução do edema (VANE, 1971). O tratamento agudo do OFCC por via oral nas concentrações 200 e 400 mg/kg não demonstrou redução estatisticamente significativa do edema de pata comparado ao grupo controle ($P > 0,05$). Este fato se deve, possivelmente, a baixa concentração de constituintes bioativos (ácidos graxos) presentes no óleo ao atingir a corrente sanguínea, uma vez que, os ácidos graxos ingeridos por via oral são metabolizados no fígado em moléculas importantes para várias vias metabólicas, com importância nutricional ao indivíduo (SILVERTHORN, 2003).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- Os constituintes presentes no OFCC não apresentam atividade fotossensibilizante na presença de luz UVA sobre micro-organismos *E. coli* e *S. aureus*. Também foi possível observar ausência de atividade antimicrobiana contra os organismos testados. O ensaio sugere segurança na aplicação tópica em contato com a luz UVA;
- O OFCC bruto e em concentrações acima de 8 mg/orelha (edema induzido por óleo de croton) possuem efeito anti-inflamatório quando administrado topicamente em camundongos (efeito local);
- O OFCC demonstrou eficácia na redução de inflamação induzida por aplicação múltipla de óleo de croton cutânea crônica, com tratamento crônico;
- A redução do percentual de edema induzido por ácido araquidônico em orelha de camundongos e a potencialização do efeito da indometacina pelo OFCC na aplicação tópica sugerem a diminuição dos efeitos de metabólitos inflamatórios do AA, podendo sua ação estar ligada à inibição de COX e LOX ou receptores de prostaglandinas e/ou à produção de eicosanoides anti-inflamatórios;
- O OFCC bruto não foi capaz de reduzir o edema induzido pela capsaicina nem pela histamina, sugerindo que o extrato bruto não inibe a liberação de mediadores vasoativos como CGRP, substância P, taquicininas, histamina e serotonina;
- A aplicação de OFCC bruto em dermatites de contato irritativas demonstrou ser eficaz pela redução de edema induzido por fenol;
- A administração por via oral do OFCC solubilizado em 2% de Tween 80 até a concentração 400 mg/kg não demonstrou atividade anti-inflamatória em ratos,

demonstrando não haver efeito sistêmico dos constituintes químicos do OFCC.

- Correlacionando os dados observados com a literatura, os ácidos graxos presentes no OFCC (como o ácido oleico e linoleico) e os carotenoides podem estar envolvidos na atividade anti-inflamatória observada em camundongos, seja pelo efeito antioxidante do óleo (capaz de reduzir ROS) e/ou por influência na produção de metabólitos derivados do AA.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

ALLEN-JÚNIOR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8^o ed, São Paulo: Artmed, 2007, 775 p.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA-JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, May./Jun. 2000

ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae): an economically valuable species of the Central Brazilian Cerrados. **Economic Botany**, v. 49, p. 40-48, 1995.

AUGUSTO, L.G.S.; GÓES, L. Integrated understanding for health surveillance in a forest environment: the case of the Araripe Plateau in Ceará State, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, sup 4, p. S549-S558, 2007.

AZEVEDO, C.M.A. **Bioprospecção**: Coleta de material biológico com a finalidade de explorar os recursos genéticos. Cad. n. 17, 2. ed. revisada. Série Ciência e Pesquisa. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, p. 385–396, 2004.

BADILLA, B.; CAMBRONERO, J.; CICCÍÓ, J. F.; CORDERO, T.; MORA, G. Determination of topical anti-inflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, Jul-Sep. 2007.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Vol. 1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos; São Paulo: EDUSP, 1978, 255 p.

BAZZANO, Félix Carlos Ocariz. Aspectos Éticos da Pesquisa Científica, p. 149-180. In: SILVA, José Vitor da (Org.) et al. **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa**. 1. ed. São Paulo: Iátria, 2006.

BEZERRA, J. C. B.; SILVA, I. A.; FERREIRA, H. D.; FERRI, P. H.; SANTOS, S. C. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 73, p. 428-430, 2002.

BLAZSÓ, G.; GÁBOR, M. Effects of prostaglandin antagonist phloretin derivatives on mouse ear edema induced with different skin irritants. **Prostaglandins**, v. 50, p. 161-168, 1995.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Oficial, 1960, 540 p.

BRAND, C.; TOWNLEY, S.L.; FINLAY-JONES, J.J.; HART, P.H. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v.51, p. 283-289, 2002.

BRASIL. Lei Nº 11.794 de 08 de outubro de 2008 ("lei Arouca"), regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei Nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 out. 2008.

_____. Resolução Nº 196/96 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. **Bioética**, v. 4, n. 2, p. 15-25, 1996.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Lipids**, v. 36, n. 9, p. 1007-1024, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 3, p. 37-39. São Paulo, Julho/Set. 2003.

CAMPOS, F. G.; WAITZBERG, D. L.; LOGULO, A. F.; TORRINHAS, R. S.; TEIXEIRA, W. G. J.; HABR-GAMA, A. Imunonutrição em colite experimental: efeitos

benéficos dos ácidos graxos ômega-3. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 39, n. 1, jan-mar 2002.

CARDOSO, Telma Abdalla de Oliveira. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletim Central. Panamaense Febre Aftosa**, v. 64-67, p. 3-17, 1998-2001.

CARLSON, R.; O'NEILL-DAVIS, O.; CHANG, J.; LEWIS, A. J. Modulation of mouse ear edema by cicloxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 17, p. 197-204, 1985.

CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CORMACK, D. H. **Ham Histologia**. 9. ed. Trad. Jorge José de Carvalho [*et al*]. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, 570 p.

COSTA, I. R.; ARAUJO, F. S.; LIMA-VERDE, L. W. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na chapada do Araripe, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 4, p. 759-770, 2004.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins – Patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, 1251 p.

CRUMMEY, A., HARPER, G. P., BOYLE, E. A., MANGAN, F. R. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical anti-inflammatory compounds. **Agents Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

DE YOUNG, L. M., KHEIFETS, J. B., BALLARON, S. J., YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p. 335-341, 1989.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DOBSON, A. P. **Conservation and biodiversity**. New York: Scientific American Library, 1996, 264 p.

DOHERTY, N.S.; BEAVER, T. H.; RHEINS, L. A.; NORDLUND, J. J. Multiple topical applications of arachidonic acid to mouse ears induce inflammatory and proliferative changes. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 91, n. 4; Oct. 1988.

FERRANDIZ, M. L.; GIL, B.; SANZ, M. J.; UBEDA, A.; ERAZO, S. GONZÁLEZ, E.; NEGRETE, R.; PACHECO, S.; PAYA, M.; ALCARAZ, M. J. Effect of Bakuchiol on Leucocyte Functions and Some Inflammatory Responses in Mice. **Journal of Pharm. Pharmacology**, v. 48, n. 9, p. 975-980, 1996.

FIGUEIREDO, R. W.; MAIA, G. A.; FIGUEIREDO, E. A. T. Propriedades físico-químicas e composição dos ácidos graxos da fração lipídica da polpa e amêndoa do piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm). **Revista de Ciências Agrônômicas**, Fortaleza, v.20, n. 1/2, p. 135-139 Jun./dez. 1989.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Influência de processos Redox na resposta inflamatória da artrite reumatoide. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 48, n.1, p. 17-24, jan/fev, 2008.

FORSLIND, B.; ENGSTRÖM, S.; ENGBLOM, J.; NORLÉN, L. A novel approach to the understanding of human skin barrier function. **Journal of Dermatological Science**, Sweden, v. 14, n. 2, p. 115-125, 1997.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FRITSCHKE, K. L. Too much linoleic acid promotes inflammation – doesn't it? **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 79, p. 173–175, 2008.

GABOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

_____, RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GREEN, C.A.; SHUSTER, S. Lack of effect of topical indomethacin on psoriasis. **British Journal of Clinical Pharmacology**. v.24, p. 381-384, 1987.

GUARIM-NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p.13-28.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475–477, 1973.

HENRY, G. E.; MOMIN, R. A.; NAIR, M. G.; DEWITT, D. L. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v, 50, p. 2231-2234, 2002.

HENSON, P. M. **Dampening inflammation**. *Nature Immunology*, v. 6, n. 12, Dec. 2005.

HERZOG-SOARES, J. D.; ALVES, R. K.; ISAC, E.; BEZERRA, J. C. B.; GOMES, M. H.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Atividade tripanocida *in vivo* de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12 (supl), p. 1-2, 2002.

HOHLFELD, T.; POTT, A.; SCHRÖR, K. Oleic and palmitic acid interfere with the inhibition of platelet function and thromboxane formation by aspirin: a possible mechanism of aspirin resistance. **Circulation**, v. 118, p. S-374-S375, 2008.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1614-1620, 1993.

_____; _____; _____. Participation of serotonin in capsaicin-induced mouse ear edema. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 69, p. 61-68, 1995.

ISSA, A. Y.; SURESH, R. V.; WARGOVICH, M. J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: new directions and perspectives. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 405-419, 2006.

IVERSEN, L.; KRAGBALLE, K. Arachidonic acid metabolism in skin health and disease. **Prostaglandin & other Lipids Mediators**, v. 63, p. 25-42, 2000.

JAMES, M. J. GIBSON, R. A.; CLELAND, L. G. Dietary polyunsaturated fatty acids and inflammatory mediator production. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71 (suppl), p. 343S–348S, 2000.

KEER, W. E.; SILVA, F. R.; TCHUCARRAMAE, E. Pequi (*Caryocar brasiliense* camb.): informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 169-171, abr. 2007.

KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L. O.; OLIVEIRA, A.B.B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 442-448, 2007.

KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Trad.: Ana Cristina Arámburu da Silva [et al]. Porto Alegre: Artmed, 2008.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C. S.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre: Metrópole, 2003.

LAPA, F. R. **Avaliação da atividade antinoceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica do extrato hidroetanólico bruto de *Polygala paniculata* L.** 2006. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná e Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba, 2006.

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Reviews Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1983.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, Oct. 2002.

LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacological Research**. v. 27, n. 4, p. 442-448, 2004.

LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p.189 –196, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA-JÚNIOR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACHADO, J. G. S.; PINHEIRO, M. S.; MARÇAL, S. H. et al. Análise bioética da legislação brasileira aplicável ao uso de animais não-humanos em experimentos científicos, p. 45-62. In: GARRAFA, Volnei; CORDÓN, Jorge (Orgs.). **Pesquisas em Bioética no Brasil de hoje**. São Paulo: Gaia, 2006.

MAMEDE, J. A. V.; ENNES, D. K.; COSTA, E. B.; DAVINI, E.; MONTE, A.; MAGALHÃES, G.; LINERO, S. A.; GUARIENTO, A. Radicais livres e mecanismos fisiopatogênicos. **Journal of Biomolecular Medicine Free Radicals**, v. 2, n. 4, p. 113-115, 1996.

MANN, J. **Secondary metabolism**. 2nd Edition. Oxford: Clarendon Press, 1987.

MANTIONE, C. R.; RODRIGUEZ, R. A bradykinin (BK)₁ receptor antagonist blocks capsaicin-induced ear inflammation in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 99, p. 516-518, 1990.

MARCHIONNI, A. M. T.; PAGNONCELLI, R. M.; REIS, S. R. A. Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência**, PUCRS, v. 21, n. 51, jan./mar. 2006

MARQUES, M. C. S.; CARDOSO, M. G.; SOUZA, P. E.; GAVILANTES, M. L.; SOUZA, J. A.; PEREIRA, N. E.; NEGRÃO, I. O. Efeito fungitóxico dos extratos de *Caryocar brasiliense* Camb. sobre os fungos *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras. Edição Especial, p. 1410-1419, dez. 2002.

MARTINS, R. L.; GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae): uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v.30, n.1, p.37-45, jan-mar. 2007.

MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, C. P.; PASSOS, G. F.; CALIXTO, J. B. Reduced skin inflammatory response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 390-395, 2009.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998.

MOTTER, M. D. S.; SILVA, L. D.; BORGES-DE-OLIVEIRA, R.; YAMADA, A. T.; SANTOS, S. C.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T. Índice mitótico em células epiteliais da brânquia de Guaru (*Poecilia vivipara*) tratados com frações da casca do caule e da folha de Pequi (*Caryocar brasiliensis*). **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 221-227, 2004.

MORROW, J. D.; ROBERTS-II, L. J. Analgésicos: antipiréticos, agentes antiinflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: Goodman & Gilman, editores. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 2003. Cap. 27, p.517-50.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. Lípidos: química y productos naturales que los contienen. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 435-466.

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

MURRAY, A. R.; KISIN, E.; CASTRANOVA, V.; KOMMINENI, C.; GUNTHER, M. R.; SHVEDOVA, A. A. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1769-1777, 2007.

NAIR, M.K.N.; VASUDEVAN, P.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of black seed oil on *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 16, p. 395-398, 2005.

OLIVEIRA, I. G.; CARTAXO, S. L.; SILVA, M. A. P. Plantas medicinais utilizadas na Farmacopéia Popular em Crato, Juazeiro e Barbalha (Ceará, Brasil). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 189-191, jul. 2007.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA, T. F.; GARCIA, A. C. F.; SILVA, M. R. R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, nov/dez 2002.

_____; CASTRO, A. C. M.; PIRES, J. S.; GARCIA, A. C. F.; CAMPOS, F. C.; FERNANDES, O. F. L.; PAULA-JÚNIOR, J. R.; FERREIRA, H. D.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H.; SILVA, M. R. R. Composition and antifungal activity of the essential oils of *Caryocar brasiliensis*. **Formely International Journal of Pharmacognosy**, v. 41, n. 5, p. 319-324, August 2003.

PAULA JÚNIOR, W. **Atividades biológicas in vitro de extratos hidroetanólicos de folhas e do mesocarpo interno de *Caryocar brasiliense* Cambess.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

_____; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16 (supl.), p. 625-630, Dez. 2006.

PENHA, A. R. S. **Estudo de atividade antiulcerogênica de plantas da chapada do Araripe.** Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), 2007. Universidade Regional do Cariri, Crato, 2007.

PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de *Caryocar brasiliense* Camb., Caryocaraceae.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 237-243, 2001.

PINTO, G. C. P. Recursos genéticos de fruteiras nativas na região Nordeste de Brasil. In: Simpósio Nacional de Recursos Genéticos de Fruteiras Nativas. **Anais**, p. 81-86, Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMP, 1993.

PRANCE, G. T.; SILVA, M. F. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Caryocaraceae. **Rodriguésia**, v. 57, n.2, p. 155-157, 2006.

PUNGERÓ, V.; TURULL, A.; QUERALT, J. Arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA) exert systemic effects when applied topically in the mouse. **Inflammation**, v. 22, n. 3, 1998.

QUIRINO, G. S. **Atividade cicatrizante e gastroprotetora de *Caryocar coriaceum* Wittm.** Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular), 2009. Universidade Regional do Cariri, Crato, 2009.

RAMOS, M. F. S.; SANTOS, E.P.; SILVA, A. B.; LEITÃO, A. C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.M. Avaliação fototóxica e *screening* mutagênico de extratos de propolis, *Aloe* spp. e *Hamamelis virginiana*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 26, n.2, p. 105-111, 2005.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. 6. ed. Trad.: Raimundo Rodrigues Santos [*et al*]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REDONDO, P.; GARCIA-FONCILLAS, J.; ESPANA, A.; GUEVILLAS, F.; QUINTANILLA, E. Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expresión in human keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 186-194, 1997.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2006.

RINGBOM, T.; HUSS, U.; STENHOLM, Å.; FLOCK, S.; SKATTEBØL, L.; PERERA, P.; BOHLIN, L. COX-2 inhibitory effects of naturally occurring and modified fatty acids. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 745-749, 2001.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1978 (5ª reimpressão, 1995).

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev., 2001.

ROESLER, R.; MALTA, L. G. CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, jan.-mar. 2007.

ROITH, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6. ed. Trad.: Ida Cristina Gubert. Barueri, SP: Manole, 2003.

SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v.15, p. 549-557, 2004.

SANTOS, E. P.; GARCIA, S.; FREITAS, Z. M. F.; BARTH, A. L. Avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares. **Revista Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 2, n. 2, p. 71-76, Jul/Dez 2001.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 403-434.

SILVA, M. A. P.; MEDEIROS-FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Ciências Agronômicas**, Fortaleza, v. 37, n. 3, p. 320-325, 2006a.

_____; _____. Emergência de plântulas de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista de Ciências Agronômicas**, Fortaleza, v.37, n.3, p. 381-385, 2006b.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 2. ed. Trad.: Ivana Beatrice Mânica da Cruz. Barueri, SP: Manole, 2003.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007, p. 467-495.

SIMPOULOS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 60, p. 502-207, 2006.

SINGH, S.; MAJUMDAR, D. K.; REHAN, H. M. S. Evaluation of anti-inflammatory potential of fixed oil of *Ocimum sanctum* (Holybasil) and its possible mechanism of action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 54, p. 19-26, 1996.

SOUZA, C. D.; FELFILI, J.M. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 1, p. 135-142, 2006.

STANLEY, P. L.; STEINER, S.; HAVENS, M.; TRANSPOSCH, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Journal of Pharmacological and Biophysiological Research**, v. 4, n. 4, 1991.

STEVENS, P. F. **Angiosperm Phylogeny Website**. Available online <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Version 9, June, 2008.

STRUEBE, M. G. Molecular mechanisms involved in the regulation of prostaglandin biosynthesis by glucocorticoids. **Biochemical Pharmacology**, v. 53, p. 1389-1395, 1997.

SURH, Y. J. **Oxidative stress, inflammation, and health**. Packer L (ed.). London: Taylor & Francis, 2005.

SWINGLE, K.F.; SHIDEMAN, F.E. Phases of inflammatory responses to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmacological and Experimental Therapy**, v. 183, p. 226-234, 1972.

TAKEDA, A. K.; TAKEDA, I. J. M., FARAGO, P. V. Unidades de conservação dos Campos Gerais, Paraná. **Publicatio UEPG (Biological and Health Science)**, v. 7, n. 1, p. 57-78, 2001.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential oil safety: a guide for health care professionals**. New York: Churchill Livingstone, 1995.

TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

TOWBIN, H.; PIGNAT, W.; WIESENBERG, I. Time dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema. **Inflammation Research**, v. 44, p. S160-S1, 1995.

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

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nature, New Biology**, v. 231, p. 232-235, 1971.

_____. In: GÁBOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, v. 11, 2000.

VIEIRA, R. F. Conservation of medicinal and aromatic plants in Brazil. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999, p. 152-159.

WAGNER, H.; WISENAUER, M. **Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WANG, B.; FUJISAWA, H.; ZHUANG, L.; FREED, I.; HOWELL, B.G.; SHAHID, S., SHIVJI, G.M.; MAK, T. W.; SAUDER, D.N. CD⁴⁺ Th1 and CD⁸⁺ type 1 cytotoxic T-cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 6783-6790, 2000.

WANG, H. Q.; KIM, M. P.; TIANO, H. F. LANGENBACH, R.; SMART, R. C. Protein kinase C-alpha coordinately regulates cytosolic phospholipase A₂ activity and the expression of cyclooxygenase-2 through different mechanism in mouse keratinocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 860-866, 2001.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan induced oedema in hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

YOON, J. H., BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, p. 585-596, 2005.

YOUNG, J. M.; SPIRES, D. A.; BEDORD, C. J.; WAGNER, B.; BALLARON, S. J.; DE YOUNG, L. M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 367-371, 1984.

ZHAO, G.; ETHERTON, T. D.; MARTIN, K. R.; HEUVEL, J. P. V.; GILLIES, P. J.; WEST, S. G.; KRIS-ETHERTON, P. M. Anti-inflammatory effects of polyunsaturated fatty acids in THP-1 cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 909-917, 2005.

ZIBOH, V. A.; MILLER, C. C.; CHO, Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of anti-inflammatory and antiproliferative metabolites. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71(suppl), p. 361S-366S, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE A – TABELAS

Tabela A1. Percentual de edema de orelha (PE) induzido pela aplicação única de óleo de croton (OC) em camundongos Swiss e efeito inibitório médio da inflamação (EIM) após tratamento com OFCC.

Tratamento ⁽¹⁾	ÓLEO DE CROTON	
	PE ⁽²⁾ (%)	EIM (%)
Controle	167,3 ± 9,6	—
IND	109,2 ± 15,0 * #	34,7 * #
DEX	24,5 ± 2,7 ***	85,4 ***
OFCC 1 mg/orelha	145,3 ± 18,7	13,2
OFCC 2 mg/orelha	143,2 ± 10,1	14,4
OFCC 4 mg/orelha	149,8 ± 9,7	10,5
OFCC 8 mg/orelha	119,7 ± 9,5 * #	28,5 * #
OFCC 12,5 mg/orelha (bruto)	113,8 ± 14,4 * #	32,0 * #

⁽¹⁾ Controle: Salina + 2% Tween 80; IND: indometacina; DEX: dexametasona; OFCC: óleo fixo de *C. coriaceum*.

⁽²⁾ Dados expressos em média ± E.P.M.

*P < 0,05 e ***P<0,001 comparadas ao controle; #P < 0,05 comparadas à DEX (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela A2. Percentual de edema de orelha (PE) induzido pela aplicação múltipla de óleo de croton (OC) em camundongos Swiss e efeito inibitório médio da inflamação (EIM) após tratamento múltiplo com OFCC avaliados após 192 horas da primeira aplicação de OC.

Tratamento ⁽¹⁾	ÓLEO DE CROTON	
	PE ⁽²⁾ (%)	EIM (%)
Controle	90,40 ± 9,1	—
DEX	36,02 ± 3,8 ***	60,2 ***
OFCC bruto	53,01 ± 7,9 **	41,4 **

⁽¹⁾ Controle: Salina; DEX: dexametasona; OFCC: óleo fixo de *C. coriaceum*.

⁽²⁾ Dados expressos em média ± E.P.M. **P<0,01; ***P<0,001 comparadas ao controle (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela A3. Percentual de edema de orelha (PE) induzido pela aplicação de ácido araquidônico (AA) em camundongos *Swiss* e efeito inibitório médio da inflamação (EIM) após tratamento com OFCC.

Tratamento ⁽¹⁾	AA	
	PE ⁽²⁾ (%)	EIM (%)
Controle	147,4 ± 7,2	—
IND	43,1 ± 3,3 ***	70,8 ***
DEX	104,7 ± 13,4 *#	28,9 *#
OFCC bruto	74,09 ± 14,3 ***	49,7 ***

⁽¹⁾ Controle: Salina; DEX: dexametasona; OFCC: óleo fixo de *C. coriaceum*.

⁽²⁾ Dados expressos em média ± E.P.M.

*P<0,05; **P<0,01 e ***P<0,001 comparadas ao controle; #P < 0,05 comparadas à IND (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela A4. Percentual de edema de orelha (PE) induzido pela aplicação de capsaicina (CAP) em camundongos *Swiss* e efeito inibitório médio da inflamação (EIM) após tratamento com OFCC.

Tratamento ⁽¹⁾	CAP	
	PE ⁽²⁾ (%)	EIM (%)
Controle	35,11 ± 3,2	—
DEX	14,56 ± 1,4 **	58,5 **
OFCC bruto	34,51 ± 5,7	1,7

⁽¹⁾ Controle: Salina; DEX: dexametasona; OFCC: óleo fixo de *C. coriaceum*.

⁽²⁾ Dados expressos em média ± E.P.M. **P<0,01 comparadas ao controle (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela A5. Percentual de edema de orelha (PE) induzido pela aplicação intradérmica de histamina em camundongos *Swiss* e efeito inibitório médio da inflamação (EIM) após tratamento com OFCC.

Tratamento ⁽¹⁾	HISTAMINA	
	PE ⁽²⁾ (%)	EIM (%)
Controle	53,87 ± 12,3	—
DEX	18,45 ± 1,9 *	65,7 *
OFCC bruto	46,40 ± 7,5	13,8

⁽¹⁾ Controle: Salina; DEX: dexametasona; OFCC: óleo fixo de *C. coriaceum*.

⁽²⁾ Dados expressos em média ± E.P.M. *P<0,05 comparadas ao controle (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela A6. Percentual de edema de orelha (PE) induzido pela aplicação de fenol em camundongos *Swiss* e efeito inibitório médio da inflamação (EIM) após tratamento com OFCC.

Tratamento ⁽¹⁾	FENOL	
	PE ⁽²⁾ (%)	EIM (%)
Controle	188,7 ± 3,7	—
DEX	133,0 ± 8,7 **	29,5 **
OFCC bruto	115,4 ± 15,2 ***	38,8 ***

⁽¹⁾ Controle: Salina; DEX: dexametasona; OFCC: óleo fixo de *C. coriaceum*.

⁽²⁾ Dados expressos em média ± E.P.M. **P<0,01; ***P<0,001 comparadas ao controle (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

APÊNDICE B – PUBLICAÇÕES

Submissão de Pedido de Patente:

Título: **ÓLEO DA POLPA DO FRUTO DO PEQUI DO NORDESTE (*Caryocar coriaceum* Wittm) OBTIDO COM SOLVENTES ORGÂNICOS: UM PRODUTO DE ORIGEM NATURAL PARA USO EM SUPLEMENTOS VITAMÍNICOS, COMO ANTIOXIDANTE E APLICADO AO TRATAMENTO DE INFLAMAÇÕES CUTÂNEAS AGUDAS E CRÔNICAS.**

Autores: Rogério de Aquino Saraiva, Mariana Késsia Andrade Araruna, Glauberto da Silva Qurino, José Galberto Martins da Costa, Marta Regina Kerntopf, Adriana Rolim Campos Barros, Irwin Rose Alencar de Menezes.

Pedido submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI, Brasil), no dia 06/07/2009.

Apresentações de trabalhos em congressos:

1. SARAIVA, R. A.; LEITE, G. O.; OLIVEIRA, R. C.; ARARUNA, M. K. A.; MENEZES, K. D. P.; PEREIRA, C. K. B.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory activity of *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*) pulp fruit and seed oils. In: The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas-PE. **Annals of the 4th BrazMedChem2008: Systems Chemical Biology**, 2008.
2. SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; LEITE, G. O.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. Efeito anti-inflamatório local e sistêmico do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm. (*Caryocaraceae*). In: IV Reunião Regional da FeSBE, 2009, Goiânia. **Anais da IV Reunião Regional da FeSBE**, 2009.
3. SARAIVA, R. A.; SAMPAIO, R. S.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; FERNANDES, C. N.; SOUZA, H. H. F.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R.; KERNTOPF, M. R.; MENEZES, I. R. A. Ação antiedematogênica do óleo fixo de *Caryocar coriaceum* Wittm no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico. In: IV Reunião Regional da FeSBE, 2009, Goiânia. **Anais da IV Reunião Regional da FeSBE**, 2009.
4. SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; MENEZES, K. D. P.; OLIVEIRA, R. C.; LEITE, G. O.; SOUZA, H.H.F.; FERNANDES, C.N.; COSTA, J. G. M.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Comparison between topical and *per os* treatments from *Caryocar coriaceum* Wittm. fruit pulp fixed oil on murine inflammation. In: 41^º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental - SBFTE, 2009, Ribeirão Preto. **Anais do 41^º Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2009.