



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI – URCA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR – PPBM  
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

**Identificação química e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo fixo extraído da gordura de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae)**

DÉBORA LIMA SALES

CRATO, CE

2012

DÉBORA LIMA SALES

**Identificação química e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo fixo extraído da gordura de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae)**

Orientador: Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como pré-requisito para obtenção de título de mestre em Bioprospecção Molecular.

CRATO, CE

2012

**Identificação química e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo fixo extraído da gordura de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae)**

Esta Dissertação foi 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, e encontra-se disponível na Biblioteca da mesma Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

---

Débora Lima Sales

Dissertação apresentada e aprovada em 11/10/2012

Examinadores:



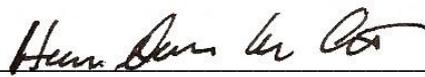
---

Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida (Orientador)  
Universidade Regional do Cariri - URCA



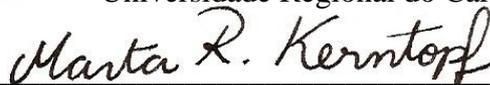
---

Prof. Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves (Co-Orientador )  
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB



---

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Avaliador)  
Universidade Regional do Cariri - URCA



---

Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf (Avaliadora)  
Universidade Regional do Cariri - URCA

---

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Suplente)  
Universidade Regional do Cariri - URCA

*Aos que (com orgulho) chamo de meus!*

(Débora Lima Sales)

## AGRADECIMENTOS

À minha família as palavras mais difíceis e mais preciosas. Sei o quanto fui ausente em casa, nos feriados e encontros familiares, mas vocês sempre apoiaram tudo o que decidi fazer, com confiança e esperança em mim, mesmo quando não entendiam os motivos que me faziam estar distante:

- Aos meus pais, Fernando Sales e Francisca Lima, pelo amor, força, sabedoria e coragem que tiveram todos esses anos, pelos valores que nos transmitiram e por nos ter ensinado a lutar por ideais! Às minhas irmãs, Fernanda Lima e Sarah Lima, pela amizade, companheirismo, cumplicidade, e paciência comigo nos momentos mais estressantes dessa jornada. À minha sobrinha Ana Maria, por ser meu novo e mais sincero motivo de sorrir e fazer sorrir, além de possuir o sorriso banguelo mais gostoso de ver! Darei o meu melhor para agradecer em atitudes a presença dos cinco em minha vida e tudo o que fizeram por mim e por meus sonhos. Eu amo muito vocês!

- Ao meu avô Ozéias Paulo (*in memoriam*) por me mostrar desde cedo o valor da gratidão, respeito e humildade. Mesmo sem conhecer ciência foi o primeiro a me ensinar sobre etnozoologia. Saudades, Vô!

- Aos meus avós Francisco Sales e Francisca Sales (vô Salim e vó Quinha): ele por passar aos seus netos o gosto pela leitura e pela música; ela por ser a mais otimista em relação à minha carreira, desde que entrei no mestrado ela diz a todo mundo que já tem uma neta fazendo doutorado. Espero que ela esteja certa e que eu possa chegar lá!

Aos meus amigos (minha família escolhida), que trouxeram alegria e alívio nos dias de sufoco. Em especial a Aline Lima, Olga Paiva, Jéssika Dias, Kadidja Luciana, Gertrudes Nunes e João Bandeira por serem ouvidos de anjos sempre que precisei, pelas palavras de conforto e conselhos, por aguentarem meus dilemas, por serem muros firmes quando tudo para mim desabava e ainda por me aceitarem como amiga. Tamires Nascimento (Nega), Tamiris Silva (Piquena), Mikkael Duarte, Mário Machado, João, Kadidjão, Florzinha e Tudinha, por serem as minhas certezas de boas conversas e risadas, tranquilidade e encontros divertidos. Ao Paulo Felipe meu “Muito Obrigada!” pelas aulas de estatística e paciência de professor. À Patrícia Oliveira fisicamente distante, mas presente em incentivos e carinho. À Dra. Girlaine Alencar, professora e amiga pela atenção de sempre! À minha mais recente amiga Nayara Santana pelo apoio, cuidado e atenção. Tenho muito orgulho de ter vocês todos por perto e poder chamá-los de Amigos! Amigos que amo!

Ao meu orientador e amigo Dr. Waltécio de Oliveira Almeida, pelos ensinamentos, paciência e incentivos desde a minha graduação, pelas atuais críticas e sugestões que contribuíram e nortearam o meu estudo e vida acadêmica. Agradeço a partilha do saber, da amizade e do carinho! Obrigada por acreditar, confiar e torcer por mim, Waltécio! Muito obrigada por tudo!

Ao professor Dr. José Galberto Martins da Costa por abrir as portas do laboratório e pelas importantes contribuições ao curso. À equipe do LPPN, em especial a professora Msc. Fabíola Rodrigues, Manuele Eufrásio, George Souza e Valmir Emanuel, pela dedicação e paciência ao me ajudar. Não importando quantos dias ou horas ficamos no laboratório, o humor e a calma de vocês foram essenciais. Obrigada!

Ao professor Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pelas contribuições e por disponibilizar o laboratório para os testes microbiológicos. À equipe do LMBM, em especial à professora Msc. Maria Flaviana Moraes pelos ensinamentos, incentivos e constante doçura, e aos alunos Saulo Tintino, Gláucia Guedes e Jacqueline Andrade, pela ajuda na realização dos testes.

Aos professores Dr. Irwin Rose Alencar de Meneses e Dra. Marta Regina Kerntopf por dar acesso ao laboratório, permitindo a realização dos testes farmacológicos, e pelas discussões e contribuições ao trabalho. Às meninas do laboratório: Andreza Guedes, Alaiane Nunes, e Renata Sampaio por tudo que fizeram para me ajudar, muito obrigada!

Ao professor Dr. Robson Waldemar Ávila e sua equipe pela identificação dos espécimes e tomo do material coletado.

Aos demais professores do curso com os quais aprendi muito sobre ciência, respeito, e dedicação. Aos coordenadores professores Dr. Alysson Pontes Pinheiro e Dr. Waltécio Oliveira Almeida sempre atentos aos alunos e dispostos a melhorar as condições do nosso curso. Às secretárias pela disponibilidade em ajudar e competência, em especial a Maria Lenira Pereira, sempre atendendo a todos com gentileza e boa vontade.

Ao professor Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves pelo apoio, ensinamentos e disponibilidade.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização de coleta dos anuros, sem a qual o trabalho não começaria. À Universidade de Fortaleza pelo aceite do Comitê de Ética em Pesquisa Animal, necessário à realização dos testes. À Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e à Faculdade de Ciências Aplicadas Leão Sampaio pela concessão dos animais para os testes *in vivo*. À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pelas linhagens bacterianas e fúngicas cedidas para os testes *in vitro*.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos meninos do Laboratório de Zoologia pela ajuda nas coletas; almoços e cafés juntos, sempre cheios de muitas risadas e discussões sobre ciência, academia e bobagens, algumas com contribuições para o meu trabalho. João Antônio Filho, José Guilherme, Diego Teles, Samuel Brito, Samuel Ribeiro (Goiaba) e Felipe Ferreira: muito obrigada por tudo! Agradecimento especial a Felipe, pela paciência comigo, pela ajuda nos testes, textos e artigos, e pela confiança! Como diriam eles: Flw!

Aos colegas de mestrado que fizeram das aulas e encontros os momentos mais divertidos e mais lucrativos quanto ao aprendizado. Olga Paiva, Luís Jardelino, Helenice Veras, Samara Brito, Heloísa Helena, Norma Fernandes, Mariana Késia, Teógenes Matias, Flaviana Moraes, Marcos Aurélio, Cláudia Villaça, Anita Oliveira, Renata Sampaio, Ana Luiza, Diógenes Queiroz, Mário Cabral. Alguns mais que outros me ajudaram em momentos complicados e me trouxeram uma amizade que levarei pra toda a vida, obrigada!

À Maria do Carmo Silva Lemos, a querida Mocinha, pelo sorriso certo de todo dia, pelos cafés e carinhos também diários. Mocinha, querida, obrigada!

Foi muito bom saber que pude e posso contar com vocês!

## RESUMO

### **Identificação química e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo fixo extraído da gordura de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae)**

Os estudos etnozoológicos com ênfase nos conhecimentos tradicionais de comunidades têm ganhado destaque por complementarem e/ou servirem de base para o conhecimento científico em diferentes áreas. O bufonídeo *Rhinella jimi* popularmente conhecido por “sapo cururu” é utilizado na medicina tradicional para tratamento de doenças, tanto humanas quanto veterinárias (inflamações, infecções e ferimentos). Assim, o trabalho objetivou analisar a ação do óleo da banha de *R. jimi* contra bactérias de linhagens padrão e multirresistentes, bem como seu efeito combinado com aminoglicosídeos, além de investigar a atividade anti-inflamatória tópica do mesmo. Os animais foram coletados nos municípios de Crato – CE e Exú – PE, tiveram os corpos gordurosos retirados e os óleos foram extraídos em aparelho soxlet usando hexano como solvente. Cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massa foi usada pra identificar os ácidos graxos através dos ésteres metílicos. A atividade antimicrobiana dos óleos foi realizada através do método de microdiluição em caldo, frente a linhagens padrão e multirresistentes de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de linhagens fúngicas de *Candida albicans* e *Candida krusei*. A atividade antiedematogênica foi avaliada em camundongos pelos métodos de edema de orelha induzido por óleo de cróton e em ratos por edema de pata induzido por carragenina. Na determinação da concentração inibitória mínima o óleo não apresentou efeito, no entanto, quando combinado com aminoglicosídeos para *P. aeruginosa*, foi aditivo para gentamicina e indiferente a amicacina e neomicina, além de efeito sinérgico quando em associação à amicacina frente a *E. coli*. Para avaliação da atividade antiedematogênica, os óleos apresentaram redução significativa do edema, tanto na aplicação única (até 63% de redução do edema) como na aplicação múltipla (57,8% de redução), simulando, respectivamente, inflamação aguda e crônica. De acordo com os resultados são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos envolvidos nas respostas e bioatividades.

**Palavras-Chave:** “Sapo cururu”; Gordura animal; Etnozoologia; Atividade antimicrobiana; Atividade antiedematogênica.

## ABSTRACT

### **Chemistry identification and assessment of the antimicrobial and anti-inflammatory activities of the oil extracted from fat of *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae)**

The ethnozoological studies with emphasis on the traditional knowledge of communities have gained prominence by complement and/or serve as a basis for scientific knowledge in different areas. The *Rhinella jimi* (Anura: Bufonidae) popularly known as “sapo cururu” has been used in folk medicine to treat diseases, both human and veterinary as (inflammations, infections and injuries). Thus, the work aimed to analyze the action of the oil from the fat of *R. jimi* against multidrug-resistant bacteria strains and standard, as well as their combined effect with aminoglycosides, in addition to investigating the same topical anti-inflammatory activity. The animals were collected in the municipalities of Crato-CE and Exu-PE, fatty bodies had withdrawn and the oils were extracted in hexane as a solvent using soxlet. Gas chromatography coupled to mass spectrometer was used to identify through the fatty acids methyl esters. The antimicrobial activity of essential oils was performed through broth microdilution method, against standard and multidrug-resistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, Apart from fungal strains of *Candida albicans* and *Candida krusei*. The antiedematogenic activity was evaluated in mice through ear edema method induced by Croton oil and in rats by carrageenan induced paw edema. In determining the minimum inhibitory concentration the oil did not show any effect, however, when combined with aminoglycoside for *P. aeruginosa* was additive for gentamicin and indifferent to amikacin and neomycin, and synergistic effect when in association with amikacin against *E. coli*. For evaluation of antiedematogenic activity, the oils showed significant reduction of edema, both in a single application (63% of edema reduction) as multiple application (57.8% of edema reduction), simulating, respectively, acute and chronic inflammation. According to the results it needs more studies to clear the mechanisms related to bioactivities.

**Keywords:** “Sapo cururu”; Animal fat; Ethnozoology; antimicrobial activity; antiedematogenic activity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Vista dorsal de uma fêmea de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002). Foto da autora. ....27
- Figura 2:** Via geral das vias do ácido araquidônico. A fosfolipase A2 atuará sobre os fosfolípideos da membrana liberando o ácido araquidônico que será utilizado como substrato para as vias da ciclooxigenase, lipoxigenase e epoxigenase. As vias da ciclooxigenase produzem prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano. E as vias da lipoxigenase produzem leucotrienos e lipoxinas, ambas desencadearão os sintomas clínicos da inflamação. (Modificada de Golan *et al.*, 2009)..... 30
- Figura 3** - Placa de microdiluição preenchida com o inóculo e o ORJ<sub>E</sub> diluído em cada poço; Onde SA: *Staphylococcus aureus*; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; EC: *Escherichia coli*; KP: *Klebsiella pneumoniae*; CA: *Candida albicans*; CK: *Candida krusei*. Foto da autora.....42
- Figura 4** – Placas de microdiluição com resultados da modulação de antibióticos, uma hora após a aplicação de resazurina. Da esquerda para a direita *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Onde A – amicacina; N – neomicina; G – gentamicina. Fotos da autora. ....43
- Figura 5** – Aplicação na face interna da orelha. Foto da autora. ....48
- Figura 6** - Efeito tópico dos óleos fixos de ORJ<sub>E</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu - Pernambuco) e ORJ<sub>C</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Crato - Ceará) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton (OC) em camundongos *Swiss*. Os animais foram pré-tratados com salina 0,9% (Controle), dexametasona (DEX), ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> e após 15 minutos, receberam topicamente solução de óleo de cróton 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 cróton. 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  $p < 0,05$  (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls). ....52
- Figura 7** - Curva tempo-resposta do efeito do ORJ<sub>E</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu - Pernambuco) e ORJ<sub>C</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Crato - Ceará) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (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 aplicaç

OC), a orelha direita de cada animal recebeu veículo salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> bruto (20 µL, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 4 dias posteriores. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para  $P < 0,05$  (\* $p < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni)..... 53

**Figura 8 - Efeito tópico dos óleos fixos de ORJ<sub>E</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu - Pernambuco) e ORJ<sub>C</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Crato - Ceará) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos *Swiss*.** A aplicação de OC foi conduzida em dias alternados, durante 9 dias. No 5º, 6º, 7º, 8º e 9º dias do experimento, a orelha direita de cada animal recebeu salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> 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  $p < 0,05$  (\*\* $p < 0,001$  comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls)..... 54

**Figura 9 - Curva tempo-resposta do efeito do ORJ<sub>C</sub> (tratamento por via intraperitoneal) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*.** Os animais foram pré-tratados com veículo salina (controle negativo), ou ORJ<sub>C</sub> na dose 300 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 5 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)..... 56

**Figura 10 – Esquema representando a ação da 5-LOX sobre o ácido araquidônico e os efeitos causados.**..... 57

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Ésteres metílicos e ácidos graxos identificados no Óleo fixo de *Rhinella jmi* coletado em Exú- PE (ORJ<sub>E</sub>) através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectômetro de Massas (CG/EM), em ordem crescente de tempo de retenção/min (TR), classificados quanto a saturação. ....35
- Tabela 2** - Ésteres metílicos e ácidos graxos identificados no Óleo fixo de *Rhinella jmi* coletado em Crato – CE (ORJ<sub>C</sub>) através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectômetro de Massas (CG/EM), em ordem crescente de tempo de retenção/min (TR), classificados quanto a saturação. ....36
- Tabela 3** - Origem das linhagens e perfil de resistência das bactérias a antibióticos. .... 39
- Tabela 4** – Resultado do *checkerboard*, do ORJ<sub>E</sub> com amicacina, gentamicina e neomicina, frente às bactérias multirresistentes *Escherichia coli* 27 e *Pseudomonas aeruginosa* 24, e o tipo de interação do ORJ<sub>E</sub> com os aminoglicosídeos. ....45
- Tabela 5**: Cronograma de execução do teste de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton, com horários e atividades realizadas durante os nove dias de avaliação. ....49
- Tabela 6** - Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona, ORJ<sub>C</sub> e ORJ<sub>E</sub>. ....51
- Tabela 7** - Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona, ORJ<sub>C</sub> e ORJ<sub>E</sub>.....53

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMI – Amicacina

ANOVA – Análise de Variância

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM/8 – Concentração subinibitória

DEX – Dexametasona

DMSO – Dimetilsulfóxido

E.I.M – Efeito Inibitório Médio da inflamação

E.P.M. – Erro Padrão da Média

eV – Eletrovolt

GEN – Gentamicina

HIA – *Heart Infusion Agar*

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

i.d. – Indicativo de densidade

i.p. – Via intraperitoneal

IR – Índice de Retenção

LOX - lipoxigenase

Mod – Massa do disco retirado da orelha direita

Moe – Massa do disco retirado da orelha esquerda

NEO – Neomicina

OC – Óleo de cróton

ORJ<sub>C</sub> – Óleo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Crato-CE

ORJ<sub>E</sub> – Óleo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu-PE

p – Nível de significância

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

UNIFOR – Universidade de Fortaleza

URCA – Universidade Regional do Cariri

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
OBJETIVOS.....	20
Objetivo Geral.....	21
Objetivos Específicos.....	21
REFERENCIAL TEÓRICO.....	22
Etnozoologia e Zooterapia.....	23
Atividades Biológicas de Anuros.....	24
<i>Rhinella jimi</i> .....	27
Resistência Microbiana e Produtos Naturais.....	28
Processo Inflamatório e Produtos Naturais.....	29
PARTE I.....	32
Licença de Coleta e Aspectos Éticos da Pesquisa.....	33
Coleta Animal.....	33
Extração e análise da composição do óleo.....	34
Resultados e Discussão da Análise Química.....	34
PARTE II.....	38
Testes microbiológicos.....	39
<i>Linhagens bacterianas e fúngicas</i> .....	39
<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	40
<i>Teste de Suscetibilidade às Drogas</i> .....	40
<i>Método Checkerboard</i> .....	41
Resultados e Discussão dos Ensaio Microbiológicos.....	41
PARTE III.....	46
Animais.....	47

Análise anti-inflamatória através de edema de orelha.....	47
<i>Edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton</i> .....	47
<i>Edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton</i> .....	48
<i>Avaliação do edema de orelha</i> .....	49
Análise anti-inflamatória através de edema de pata .....	50
Resultados e Discussão dos Ensaio Farmacológicos .....	51
CONCLUSÕES .....	58
REFERÊNCIAS .....	60
ANEXOS .....	72

# INTRODUÇÃO

## INTRODUÇÃO

A diversidade biológica é uma fonte inesgotável de informação e matéria-prima que serve de base para sistemas de saúde tradicionais em diferentes culturas humanas. É possível encontrar, ao longo da história, evidências das mais variadas relações entre seres humanos e recursos de origem animal, vegetal e mineral (Lev, 2003).

Apesar de plantas e suas partes constituírem a maioria dos produtos utilizados nos sistemas médicos tradicionais, os animais também possuem representação significativa, tanto sendo usados inteiros como as suas partes ou produtos (Scarpa, 1981; Alves & Rosa, 2005). Alves & Alves (2011) listaram 584 espécies de animais, distribuídas em treze categorias taxonômicas distintas, sendo utilizadas com finalidade terapêutica na América Latina. No Brasil o número é bastante expressivo com 354 espécies registradas (Alves *et al.*, 2012a), o que demonstra a importância desta prática entre as populações estudadas.

O acesso reduzido das classes com menor poder aquisitivo aos medicamentos da indústria farmacêutica, e maior uso dos produtos tradicionais com testemunhos orais de sua eficácia, instiga cientistas a identificar as substâncias de real valor farmacológico, ainda desconhecidas, presentes nos zoterápicos (Rates, 2001; Costa-Neto & Alves, 2010). Assim, é possível produzir novos fármacos ou, através da ação comprovada, sintetizar moléculas quimicamente semelhantes às causadoras do efeito (But *et al.*, 1991; Zang *et al.*, 1992; Mebs *et al.*, 1996; Salvat *et al.*, 2001; Pieroni *et al.*, 2002; Shin & Pyun, 2004; Sousa *et al.*, 2010).

Dentre o conjunto de drogas em uso, os antimicrobianos e seu uso abusivo selecionam populações de agentes infecciosos com capacidade de resistência aos mesmos, limitando o uso dessas terapias em determinadas infecções (Varaldo, 2002; Deurenberger *et al.*, 2007; De Backer *et al.*, 2008). Esta resistência somada a alguns avanços no desenvolvimento de novos antimicrobianos têm levado a tratamentos multidrogas (Keith *et al.*, 2005), tal como a combinação entre antibióticos ou associados com produtos naturais, na tentativa de ampliar seu espectro de ação e minimizar os efeitos tóxicos (Salvat *et al.*, 2001; Shin e Pyun, 2004; Sousa *et al.*, 2010). Nesse sentido, uns dos principais alvos animais na pesquisa de bioprospecção são os anfíbios, especialmente anuros.

*Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) popularmente conhecido por “sapo cururu” está geograficamente distribuído em toda a região nordeste do Brasil (Stevaux, 2002). O anuro é utilizado na medicina tradicional para tratamento de doenças, tanto humanas quanto veterinárias (inflamações, infecções e ferimentos) (Ferreira *et al.*, 2009b). Estudos recentes já relatam atividades microbiológicas para extratos obtidos desses animais, que demonstram ação antileishmânia e antitripanossoma, além de reagir com diferentes linhagens bacterianas e apresentar atividade citocida (Tempone *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2012a,b). Estudos mostram as gorduras animais sendo indicadas para o tratamento de muitas enfermidades envolvendo processos inflamatórios causados ou não por infecções (Costa-Neto & Alves, 2010; Ferreira *et al.*, 2009a, 2011, 2012).

Haja vista o uso popular da espécie, bem como os registros científicos comprovando propriedades biológicas da mesma, este é o primeiro trabalho no qual se estuda a gordura do bufonídeo *Rhinella jimi*, avaliando seu potencial antimicrobiano isoladamente e em associação a medicamentos de mercado, além de examinar sua capacidade anti-inflamatória tópica e sistêmica.

O trabalho foi estruturalmente dividido para melhor compreensão dos procedimentos em cada análise biológica realizada. Assim, após os Objetivos e o Referencial Teórico seguem: Parte I com material e métodos, resultados e discussões a respeito dos aspectos éticos e legais do trabalho, bem como da identificação química dos óleos; Parte II com material e métodos, resultados e discussões dos ensaios microbiológicos; Parte III com material e métodos, resultados e discussões dos ensaios farmacológicos; e Conclusões gerais do estudo.

# OBJETIVOS

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo Geral**

Identificar quimicamente e avaliar as atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo fixo extraído da gordura de *Rhinella jimi*.

### **Objetivos Específicos**

1. Obter e identificar quimicamente o óleo fixo extraído da gordura de *R. jimi*;
2. Analisar a ação do óleo da gordura de *R. jimi* contra linhagens de bactérias e fúngicas, medindo a concentração inibitória mínima;
3. Avaliar a ação do óleo em linhagens multirresistentes, bem como seu efeito combinado com antimicrobianos;
4. Investigar a ação anti-inflamatória do óleo da gordura de *R. jimi*.

# REFERENCIAL TEÓRICO

## REFERENCIAL TEÓRICO

### Etnozoologia e Zooterapia

O comportamento humano frente aos animais é formado por um conjunto de valores, percepções e conhecimentos, bem como pela natureza das interações que os seres humanos mantêm com esses organismos (Drews, 2002). A existência das relações do homem com a natureza é explicada pela hipótese da biofilia, a qual sugere que a dependência da espécie humana com os elementos naturais é devido a sua história evolutiva, desenvolvendo com as espécies que teve contato um conjunto de informações sobre as mesmas e o ambiente, traduzidos em saberes, crenças e práticas culturais (Santos-Fita & Costa-Neto, 2007).

Assim, a ciência que se dedica ao estudo dessas interações do homem com os componentes naturais é a etnobiologia que assume ainda o papel de compreender e respeitar as diferentes culturas (Posey, 1987). Segundo Toledo & Barrera-Bassols (2010), cada pessoa transmite às novas gerações suas experiências enriquecidas e refinadas, de forma já adequada às novas circunstâncias, desta forma, a repetição dessa informação adaptada gera um aperfeiçoamento do tradicional. A etnobiologia e alguns de seus ramos trazem uma abordagem holística, bem como desafia paradigmas da ciência convencional (Funtowicz & Ravetz, 1993), criticando o mundo moderno ao buscar o resgate da “memória da espécie”, a memória bio-cultural, reivindicando e valorizando o povo que a mantém viva (Toledo & Barrera-Bassols, 2008).

De acordo com Mason (1899), a etnozootologia era a zootologia da região tal como narrada pelo selvagem, embora o termo tenha sido usado apenas no século seguinte por Henderson & Harrington (1914). Em 1990, Overall sugeriu que a etnozootologia dizia respeito ao estudo dos conhecimentos, significados e usos de animais nas sociedades humanas, mas Marques (2002) vai além ao incluir pensamentos, percepções e sentimentos humanos relacionados a animais como objeto de estudo.

Vários temas são abordados pelos etnozootólogos, tais como: percepção cultural e classificação zoológica; importância e presença de animais em mitos, contos e crenças;

aspectos biológicos e culturais da utilização dos animais pelas sociedades humanas; formas de obtenção e preparo das substâncias orgânicas extraídas dos animais para diversos fins (ritualístico, medicinal, alimentar, etc.); domesticação, verificando as bases culturais e as consequências biológicas do manejo dos recursos faunísticos ao longo do tempo; heterogeneidade biológica e processos cognitivos envolvidos no manejo e conservação dos recursos; técnicas de coleta e seu impacto sobre as diferentes populações animais (Lewis, 1991; Digard, 1992; Descola, 1998; Costa-Neto & Oliveira, 2000; Fleck e Harder, 2000; Gunnthorsdottir, 2001; Pessoa *et al.*, 2002; Motta, 2003; Martins e Souto, 2006; Mourão *et al.*, 2006; Souto, 2007; Alves, *et al.*, 2012).

Os estudos etnozoológicos com ênfase nos conhecimentos tradicionais de comunidades têm ganhado destaque por complementarem e/ou servirem de base para o conhecimento científico em diferentes áreas. Trabalhos como os de Alves (2008, 2009), Alves & Alves (2011), Ferreira *et al.* (2009b), Santos *et al.* (2012a,b) e Costa-Neto (1996, 2005) são exemplos de utilização dos recursos faunísticos para uma das finalidades mais comuns: a medicinal.

### **Atividades Biológicas de Anuros**

Dentre os táxons mencionados por Alves & Alves (2011), os anfíbios são o grupo de vertebrados com menor número de espécies citadas pelos entrevistados, sendo 47 espécies a nível mundial e 23 espécies para toda a América Latina, das quais sete espécies da família Bufonidae (*Rhinella schneideri*, *R. marina*, *R. jimi*, *R. icterica*, *Bufo bocourti*, *B. macrocristatus*, *Incilius valliceps*), cinco para Leptodactylidae (*Leptodactylus labyrinthicus*, *L. vastus*, *L. troglodytes*, *Eleutherodactylus laticeps*, *E. glaucus*), quatro para Ranidae (*Rana maculata*, *R. berlandieri*, *Lithobates montezumae*, *L. spectabilis*), cinco para Hylidae (*Hyla chaneque*, *H. venulosa*, *Trachycephalus resinifictrix*, *Phyllomedusa bicolor*, *P. burmeisteri*), um para Microhylidae (*Hypopachus barberi*), e um para Ceratophryidae (*Telmatobius culeus*). Dessas, apenas nove têm registros de uso para o Brasil (Alves *et al.*, 2012a; Alves & Alves, 2011).

Embora seja pequeno o número de espécies usado, as condições tratadas com anfíbios e seus produtos abrangem muitos dos sistemas humanos: incontinência urinária, câncer, cárie dentária, feridas, furúnculos, acne, erisipela, indução de aborto, picada de escorpião, gastrite, raiva, reumatismo, dor de ouvido, dores articulares, dores de cabeça, dores musculares, dores de garganta, alergias e diabetes (Bernarde & Santos, 2009; Ferreira *et al.*, 2009b; Alves & Alves, 2011).

É possível atribuir a pouca citação dos anfíbios como recurso medicinal à percepção que as comunidades têm desses animais, que são culturalmente vistos como perigosos, sendo por vezes dispostos em outra classificação zoológica, passando de anfíbios para insetos (Costa-Neto & Pacheco, 2004; Costa-Neto & Resende, 2004; Barros, 2005). De acordo com Costa-Neto & Pacheco (2004), o modo como as pessoas se expressam com relação aos animais que compõem a etnocategoria “insetos” (anfíbios, répteis, mamíferos, aracnídeos, além dos próprios insetos da classificação oficial), coloca em evidência os sentimentos e reações de desprezo, medo e nojo ou aversão aos mesmos. Como Lauck (2002) demonstra, o conceito de nojo ou medo ensinado na infância, frequentemente impede que a criança explore a conexão com os animais mais adiante. Na maior parte das vezes, o medo de insetos e outros animais está acompanhado por falta de informação sobre o mesmo, em relação a sua biologia, importância econômica e ecológica (Smith, 1934).

As secreções da pele dos anfíbios, por exemplo, são muito utilizadas por comunidades indígenas para variados fins, como, na ponta das zarabatanas durante as caçadas; ou para dar mais vigor aos caçadores, afastando a fraqueza e má sorte. No entanto, existem poucos registros das comunidades não-indígenas (Bernarde & Santos, 2009; Ferreira *et al.*, 2009b). Suas peles apresentam grande quantidade de substâncias bioativas já registradas na literatura (aminas biogênicas, peptídeos e alcaloides lipofílicos), sendo estas com funções de proteger contra infecções microbianas e do ataque de predadores, bem como substâncias capazes de ação citocida, cardioativas, antileishimânia e antitripanossoma (Daly *et al.*, 1992, 2004; Duellman & Trueb, 1994; Daly, 1998; Tempone *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2012ab).

Ainda como partes dos animais descritas na literatura para tratamento de enfermidades, a gordura tem destaque em todos os trabalhos cujo foco de pesquisa está nos zooterápicos. Tais substâncias dos anfíbios são utilizadas para tratar vários sintomas ou

doenças, como inflamação, reumatismo, infecção, dores de garganta, dores de ouvido, queimaduras, entre outras (Alves & Alves, 2011; Alves *et al.*, 2012b).

No entanto, este uso da herpetofauna deve ser feito com cautela, pois, segundo Dorcas & College (2008), ela possui grande importância em quase todos os ecossistemas. Muitas espécies de anfíbios e répteis vivem em habitats terrestres e aquáticos e, portanto, servem como transportadores de biomassa (ou seja, a energia e nutrientes) entre os tipos de habitat. Por isso, a diversidade e o status dessa população podem refletir a integridade ecológica de determinada área, bem como as consequências das modificações causadas pelo homem, sendo utilizados como "bioindicadores". Assim, é hoje considerado o grupo de vertebrados terrestres mais ameaçado devido ao declínio de população no mundo inteiro, embora haja discordância entre autores (Stuart *et al.*, 2004; Pimenta *et al.*, 2005). As causas podem ser o processo de urbanização que gera destruição/fragmentação de habitats, bem como poluição dos corpos d'água (Hayes *et al.*, 2010).

Segundo Riclefs (2009), a razão de se conservar a biodiversidade depende dos nossos envolvimento pessoais e valores relacionados aos nossos interesses. No mesmo sentido, Saccaro Júnior (2011), destaca que agregar valores à biodiversidade pode ser a maneira mais efetiva de proteção, assim, uma forma de extrair valor econômico da biodiversidade seria a bioprospecção, definida pelo mesmo autor como a busca sistemática por organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes provenientes de seres vivos em geral, que possam ter um potencial econômico e, eventualmente, levar ao desenvolvimento de um produto.

Os registros de espécies animais usados com finalidade terapêutica abrem um leque de opções de estudos para a etnofarmacologia, pois com as investigações dos compostos bioativos das espécies, pode-se obter um potencial para descoberta de medicamentos (Elisabetsky, 2003). No entanto, quando se trata de conservação e saúde pública, vários autores (Schunrenberger & Hubbert, 1981; Still, 2003; Alves & Rosa, 2006, 2007abc; Alves *et al.*, 2007ab) recomendam atenção quanto ao risco de contaminação por zoonoses, quanto a possibilidade de reações alérgicas, bem como quanto ao uso indiscriminado das espécies. Bernarde & Santos (2009) destacam ainda que a maioria da população desconhece as espécies utilizadas para aplicações e tratamentos, o que pode causar sérios problemas caso resolvam

ingerir ou aplicar novamente a dose da substância, tendo em vista que algumas espécies de anfíbios apresentam substâncias que podem ser letais (Monti & Cardello, 1999).

### *Rhinella jimi*

O bufonídeo *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Figura 1) popularmente conhecido por “sapo cururu”, apresenta pele espessa e coberta por glândulas, distribuídas no antebraço, pés, cloaca, e parte posterior da cabeça, possui hábitos noturnos e está geograficamente distribuído em toda a região nordeste do Brasil, tanto em lugares de baixas altitudes, como de altitudes elevadas, não havendo especializações entre as populações (Stevaux, 2002).



**Figura 1** - Vista dorsal de uma fêmea de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002). Foto da autora.

Apesar de sua ampla distribuição geográfica e de sua abundância na região Nordeste do Brasil, existem poucos estudos realizados com substâncias biologicamente ativas extraídas

a partir da pele desses anfíbios, porém existem relatos de atividades microbiológicas para extratos obtidos da pele desses animais, que demonstram atividade antileishmânia e antitripanossoma, sendo essa atividade determinada principalmente pela ação de bufadienolídeos que são esteróides cardioativos (Tempone *et al.*, 2008).

Testes buscando esclarecer a atividade microbiológica dos extratos da pele desses anfíbios foram realizados por Brito *et al.* (2012a) e Tempone *et al.* (2008). Os resultados dessas pesquisas evidenciaram que o extrato metanólico de *R. jimi* continha alcalóides, terpenos, esteróides e saponinas. Os testes microbiológicos realizados demonstram que os extratos e frações da pele de *R. jimi* interagem de diferentes formas com linhagens de bactérias. Brito *et al.* (2012b) demonstraram que o extrato metanólico de *R. jimi* produziu um ótimo perfil de atividade citocida, contra diferentes linhagens de células tumorais.

## **Resistência Microbiana e Produtos Naturais**

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético relacionado à presença de genes no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos impedindo a ação das drogas (Tavares, 1996). Um microrganismo é dito resistente a um determinado antimicrobiano quando existe uma alta probabilidade de falha na terapêutica (Mota *et al.*, 2005; Macgowan, 2008), ou quando é capaz de crescer, *in vitro*, na presença da concentração inibitória mínima que essa droga atinge no sangue (Tavares, 2001).

Uma preocupante realidade com o controle de bactérias e fungos é a rápida resistência desenvolvida aos fármacos existentes, com perda de sua eficácia (Swartz, 2000; Rossi & Andreazzi, 2005). O desenvolvimento de novos medicamentos e técnicas eficazes de manejo, bem como a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais vem aumentando o interesse das companhias farmacêuticas.

O uso abusivo de antimicrobianos e a consequente resistência dos microrganismos limita o tratamento de muitas infecções (Varaldo, 2002), como hospitalares, na pele e mucosas, do trato urinário, meningites, diarreias, olhos, ouvidos, ossos, pulmões e de sistema sanguíneo (Verhoeff *et al.*, 1999, Nostro *et al.*, 2004, Coutinho *et al.*, 2010).

Entre os microrganismos resistentes é possível citar os agentes etiológicos mais comuns em infecções: *Staphylococcus aureus* (Deurenberger *et al.*, 2007; Tortora *et al.*, 2008; Coutinho *et al.*, 2010); *Escherichia coli*, uma das principais causadoras de doenças infecciosas em pacientes imunossuprimidos (Bopp *et al.*, 1999; Luciano *et al.*, 2004; Murray *et al.*, 2004; De Backer *et al.*, 2008; Tortora *et al.*, 2008); *Pseudomonas aeruginosa*, muito resistente aos antibióticos mais comuns (Murray *et al.*, 2004). Além das espécies de fungos do gênero *Candida*, frequentes causadoras de micoses superficiais ou invasivas em seres humanos, como a candidíase (Portillo *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2004).

O uso da gordura de *Rhinella jimi* foi registrado na literatura segundo Costa-Neto & Alves (2010) e Ferreira *et al.* (2009b e 2012), para diversas doenças infecciosas e inflamatórias com possível origem microbiana, como infecções, dores de dente, de ouvido e de garganta, ferimentos em animais.

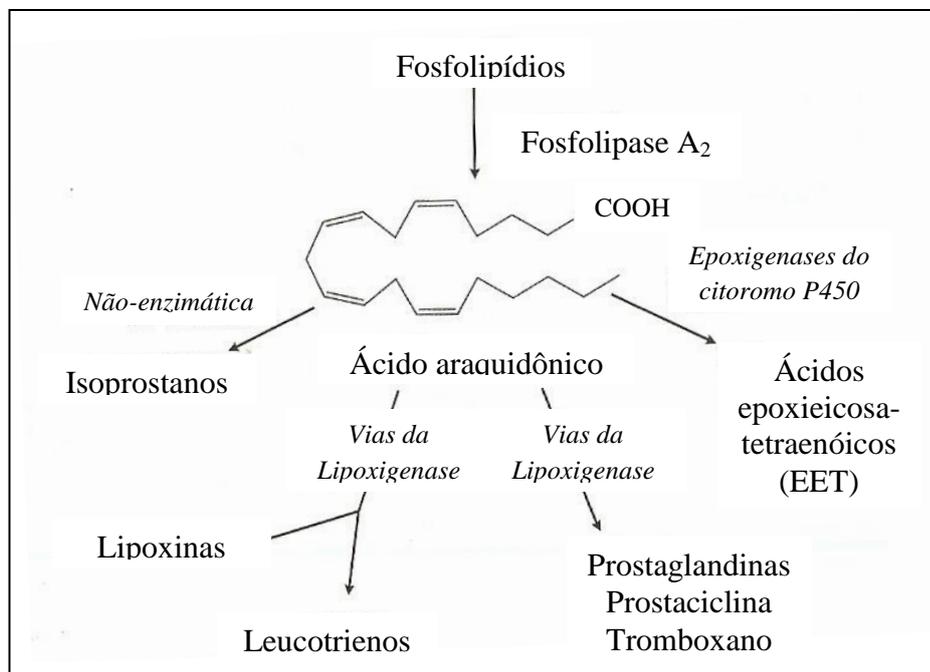
Avaliações das bioatividades de gorduras animais foram realizadas com resultados variados. A gordura de *Tupinambis merianae*, por exemplo, quando testada frente à atividade antimicrobiana, não apresentou resultados clinicamente significativos (Ferreira *et al.*, 2009a). Enquanto a gordura de *Boa constrictor* demonstrou atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (Falodun *et al.*, 2008) e efeito sinérgico na modulação de antibiótico (Ferreira *et al.*, 2011).

Neste contexto, produtos naturais podem ser ou possuir compostos potencialmente eficazes de forma direta, ou associados a antibióticos sintéticos, agindo de forma sinérgica, aditiva, antagônica ou indiferente aos mesmos (Salvat *et al.*, 2001; Gibbons, 2004; Shin & Pyun, 2004; Sousa *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012ab).

## **Processo Inflamatório e Produtos Naturais**

A presença de um microrganismo ou agente físico causador de uma lesão celular, gera no organismo, uma resposta de defesa cujo objetivo é a eliminação do agente agressor, reparo

do tecido e reestabelecimento da homeostasia da pele (Cotran *et al.*, 2000; Firestein, 2004). Assim, institui-se o processo inflamatório.



**Figura 2: Via geral das vias do ácido araquidônico.** A fosfolipase A<sub>2</sub> atuará sobre os fosfolipídios da membrana liberando o ácido araquidônico que será utilizado como substrato para as vias da ciclooxigenase, lipoxigenase e epoxigenase. As vias da ciclooxigenase produzem prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano. E as vias da lipoxigenase produzem leucotrienos e lipoxinas, ambas desencadearão os sintomas clínicos da inflamação. (Modificada de Golan *et al.*, 2009).

Eventos celulares e vasculares desenvolvem-se no tecido de acordo com o progresso da resposta inflamatória, desencadeando um quadro clínico representado por calor local, eritema, edema, dor e perda de função, dependendo do nível da resposta (Rang *et al.*, 2007; Cotran *et al.*, 2000). A síndrome clínica da inflamação é catalisada por enzimas que formam autacóides que medeiam o processo inflamatório, numa cascata fisiológica que carrega o nome de seu substrato-chave: o ácido araquidônico (Figura 2) A depender do período de duração da resposta é possível caracterizar a inflamação como aguda, na qual a resposta é rápida, com síntese e direcionamento dos mediadores ao local da lesão; ou crônica, quando permanece por mais tempo no tecido, podendo causar danos como fibrose e necrose tecidual (Collins, 1999; McDonald *et al.*, 1999).

De acordo com Burbach *et al.* (2000) a pele é a primeira barreira humana contra agentes invasores. Quando essa barreira é rompida ou incomodada, estimula-se a produção de citocinas que são fundamentais no reparo da barreira cutânea. No entanto, se a ruptura da mesma é prolongada com aumento crônico na produção de citocinas, poderá ocorrer um efeito prejudicial sobre a proliferação epidérmica (Proksch *et al.*, 2008).

A evolução no entendimento dos aspectos moleculares da fisiopatologia da inflamação favoreceu o estabelecimento de novos sistemas de testes para a seleção de diversas substâncias que permitem a identificação de novos compostos anti-inflamatórios (Carvalho, 2004).

Diversos animais inteiros ou produtos de seu metabolismo são citados na literatura como eficazes no tratamento de enfermidades que envolvem processos inflamatórios (Alves & Alves, 2011). A indicação recorrente de gorduras, por exemplo, pode sugerir a presença de compostos com propriedades anti-inflamatórias e, assim, devem ser investigadas e ter sua eficácia comprovada.

# PARTE I

**Coleta Animal e Aspectos Éticos da Pesquisa**  
**Extração e Análise Química do Óleo Fixo de *Rhinella jimi***

## **PARTE I**

Abordagem da coleta dos espécimes; aspectos éticos da pesquisa; extração do óleo fixo em aparelho soxlet e análise química do óleo fixo de *Rhinella jimi* através de cromatografia gasosa acoplada a espectômetro de massas.

### **Licença de Coleta e Aspectos Éticos da Pesquisa**

O presente trabalho teve autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO) para coleta de animais, sob número 27486-1, emitida em 21/03/2011 (Anexo I).

O projeto de dissertação foi embasado junto às normas de Bioética reconhecidas pela lei: 11.794/08, a qual regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos; bem como cria as comissões de ética para uso de animais em instituições de pesquisa (Goldim & Raymundo, 2008). Foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) para avaliação dos protocolos experimentais, sendo aprovado com número de registro: 11-009, em 07/10/2011 (Anexo II).

### **Coleta Animal**

A coleta de espécimes foi realizada no município do Crato, região do Cariri, sul do Ceará, e município de Exu, estado de Pernambuco, no período de abril a junho de 2011. Os quinze espécimes coletados vivos foram sacrificados por congelamento para posterior retirada da gordura localizada na região ventral do animal. Após identificação os animais foram fixados em formol 10%, conservados em álcool a 70% e um espécime testemunho foi tombado na Coleção Herpetológica da Universidade Regional do Cariri com número 3132.

## **Extração e análise da composição do óleo**

A extração do material de cada localidade foi realizada separadamente, sendo a primeira de Exu (ORJ<sub>E</sub>) e a segunda de Crato (ORJ<sub>C</sub>), em aparelho de Soxhlet utilizando o hexano como solvente por 4 horas. Os óleos extraídos foram levados a banho-maria a 70° por 6 horas, para a evaporação completa do solvente, depois acondicionados e mantidos em freezer para as posteriores análises.

Os óleos passaram pelo processo de saponificação com uma solução de hidróxido de potássio e metanol em refluxo por duas horas, de acordo com o método descrito por Hartman & Lago (1973). Após tratada com água e éter etílico, a fase aquosa dessa solução teve pH ajustado com o acréscimo de ácido sulfúrico. Os ácidos graxos livres foram metilados com metanol por catálise ácida para a obtenção dos respectivos ésteres metílicos, através dos quais foram identificados os ácidos graxos.

A análise da composição química dos óleos foi realizada usando um sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectro de massa (CG/EM), em aparelho SHIMADZU com detector seletivo de massa QP5050A, operando sob energia de ionização de 70eV. A coluna de capilaridade utilizada foi DB-5HT (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno); nas seguintes especificações: temperaturas de 270 °C no injetor e 290 °C no detector, tendo hélio como gás de arraste (1,0mL/min); velocidade linear de 47,3cm/seg; fluxo total de 24mL/min; fluxo de portador de 24mL/min; pressão de 107,8kPa; e a temperatura de aquecimento da coluna foi programada para 60 °C (2min) - 180 °C (1min) a 4 °C/min e de 180 - 260 °C a 10 °C/min (10min). A identificação dos componentes foi realizada por comparação entre seu respectivo espectro de massa com aqueles padrões registrados na base de dados da biblioteca Wiley 229 e entre os índices de retenção calculados com valores da literatura especializada (Stenhagen *et al.*, 1974; Alencar *et al.*, 1984; Alencar *et al.*, 1990; Adams, 2001).

## **Resultados e Discussão da Análise Química**

A análise da composição química do ORJ<sub>E</sub> por CG/EM viabilizou a identificação de doze constituintes, totalizando 93,7% dos ésteres metílicos de ácidos graxos (Tabela 1). Dessa

porcentagem 55,39% equivale a ácidos insaturados, representados pelos ácidos oleico, palmitoleico e linoleico (respectivamente 39,4%, 6,3% e 6,2% do total analisado). Já os ácidos saturados figuram 44,61%, cuja maior expressão está nos ácidos palmítico (26,8%), esteárico (8,1%) e mirístico (2,4%).

**Tabela 1** - Ésteres metílicos e ácidos graxos identificados no Óleo fixo de *Rhinella jmi* coletado em Exú- PE (ORJ<sub>E</sub>) através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectômetro de Massas (CG/EM), em ordem crescente de tempo de retenção/min (TR), classificados quanto a saturação.

Constituintes	TR (min)	(%)	Ácido graxo equivalente
<b>Saturados</b>			
Dodecanoato de metila	17.5	0.6	Ácido láurico
Tetradecanoato de metila	21.9	2.4	Ácido mirístico
Pentadecanoato de metila	23.2	1.9	Ácido pentadecanóico
Eicosanoato de metila	33.9	0.4	Ácido araquídico
Octadecanoato de metila	30.6	8.1	Ácido esteárico *
Hexadecanoato de metila	25.9	26.8	Ácido palmítico *
Heptadecanoato de metila	27.8	1.6	Ácido heptadecanóico
<b>Insaturados</b>			
(Z,Z)-Octadeca-9,12-dienoato de metila	29.5	6.2	Ácido linoleico *
(E)-Octadec-10-enoato de metila	29.8	38.0	Ácido oleico *
(Z)-Octadec-13-enoato de metila	29.9	1.4	Ácido oleico *
Hexadec-11-enoato de metila	25.3	1.4	Ácido palmitoleico
(Z)-Hexadec-9-enoato de metila	25.4	4.9	Ácido palmitoleico
<b>TOTAL</b>		<b>93.7</b>	

Nota: (\*) – Ácidos graxos majoritários.

A análise da composição química do ORJ<sub>C</sub> por CG/EM viabilizou a identificação de oito constituintes, totalizando 97,12% dos ésteres metílicos de ácidos graxos (Tabela 2). Dessa porcentagem 52,02% equivale a ácidos insaturados, representados pelos ácidos oleico,

linolenico e linoleico (respectivamente 26,32%, 9,74% e 8,98% do total analisado). Já os ácidos saturados figuram 47,98%, cuja maior expressão está ácido palmítico (40,32%).

De acordo com Melo-Júnior (2008), os ácidos graxos insaturados são mais comumente encontrados em gorduras vegetas, enquanto os saturados são mais encontrados em gorduras animais. Pesquisas anteriores e os resultados apresentados neste estudo mostram o contrário, sendo os ácidos insaturados a maioria na composição de gorduras animais (McDue, 2008; Ferreira *et al.*, 2009a, 2011). Quanto a presença dos ácidos graxos, os resultados corroboram com os trabalhos citados, sendo constantes os ácidos oleico, linoleico, palmítico e esteárico.

**Tabela 2** - Ésteres metílicos e ácidos graxos identificados no Óleo fixo de *Rhinella jmi* coletado em Crato – CE (ORJ<sub>C</sub>) através de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectômetro de Massas (CG/EM), em ordem crescente de tempo de retenção/min (TR), classificados quanto a saturação.

<b>Constituintes</b>	<b>TR (min)</b>	<b>(%)</b>	<b>Ácido graxo equivalente</b>
<b>Saturados</b>			
Hexadecanoato de metila	22.68	40.32	Ácido palmítico *
Heptadecanoato de metila	25.13	5.48	Ácido heptadecanóico
12-metil-tetradecanoato de metila	27.10	0.80	Ácido mirístico
<b>Insaturados</b>			
(Z,Z)-Octadeca-9,12-dienoato de metila	24.71	8.98	Ácido linoleico *
(Z)-Octadec-9-enoato de metila	24.81	26.32	Ácido oleico *
9,12,15-octadecatrienoato de metila	24.76	9.74	Ácido linolênico *
(Z)-Hexadec-9-enoato de metila	22.32	4.40	Ácido palmitoleico
9-dodecenoato de metila	25.98	1.08	Ácido lauroleico
<b>TOTAL</b>		<b>97.12</b>	

Nota: (\*) – Ácidos graxos majoritários.

As diferenças na composição dos ácidos pode ser explicada devido a localidade e possível mudança na dieta dos animais, visto a presença de ácidos graxos essenciais. Alguns ácidos como linoléico e linolênico não podem ser sintetizados pelos organismos animais, são

assim chamados de ácidos graxos essenciais e devem ser obtidos obrigatoriamente a partir da dieta (Moreira *et al.*, 2002).

# PARTE II

**Ensaio Microbiológico**

## PARTE II

Abordagem dos ensaios microbiológicos do óleo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu – PE (ORJ<sub>E</sub>), com determinação da concentração inibitória mínima; efeito modulatório de drogas; e método de associação para determinar o tipo de interação existente entre a droga e o produto natural.

### Testes microbiológicos

#### *Linhagens bacterianas e fúngicas*

Os experimentos foram realizados com isolados clínicos multirresistentes de *Escherichia coli* 27, *Staphylococcus aureus* 358 e *Pseudomonas aeruginosa* 24 (Tabela 3). As linhagens bacterianas padrão foram *E. coli* ATCC 10536, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362. As fúngicas *Candida albicans* ICB 12 e *Candida krusei* ATCC6258. Todas as cepas foram cedidas pela Universidade Federal da Paraíba.

**Tabela 3** - Origem das linhagens e perfil de resistência das bactérias a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i> 24	Secreção nasal	Cpm, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami

Onde: Ast – Aztreonam; Amx - Amoxicilina; Amp - Ampicilina; Ami - Amicacina; Amox - Amoxicilina, Ca - Cefadroxil; Cfc - Cefaclor; Cf - Cefalotina; Caz - Ceftazidima; Cip - Ciprofloxacina; Clo - Clorafenicol; Imi - Imipenem; Can - Canamicina; Szt - Sulfametrim; Tet - Tetraciclina; Tob - Tobramicina; Oxa - Oxacilina; Gen - Gentamicina; Neo - Neomicina; Para- Paramomicina; But - Butirosina; Sis - Sisomicina; Net - Netilmicina; Com - Cefepime; Ctz - Ceftazidime; Ptz - Piperacilina-tazobactam; Lev - Levofloxacina; Mer - Merpenem.

Todas as linhagens foram mantidas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) até os ensaios, quando colocados para crescimento em *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco), durante 24 horas a uma temperatura de 37° C (Freitas *et al.*, 1999; Coutinho *et al.*, 2008).

#### *Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

A concentração mínima inibitória (CIM) do ORJ<sub>E</sub> foi determinada através do método de microdiluição em caldo usando suspensão bacteriana de 10<sup>5</sup> cél/mL. Para a preparação da solução, 10mg da amostra solubilizados em 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, Darmstadt, Alemanha), para obter uma concentração inicial de 10mg/mL. Em seguida, esta solução sofreu sucessivas diluições em água estéril, até chegar a uma concentração de 1024µg/mL. Após preparada a placa com os inóculos, 100µL do ORJ<sub>E</sub> foi usado para a diluição seriada, logo sendo incubadas por 24h a 37°C (Javadpour *et al.*, 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual inibiu o crescimento bacteriano, para evidenciá-la usou-se uma solução indicadora de resazurina. A mudança de coloração azul para rosa devido à redução da resazurina indica o crescimento bacteriano (Palomino *et al.*, 2002), auxiliando a visualização da CIM evidenciada pela cor azul inalterada. Para visualizar o crescimento dos fungos, observou-se a turbidez.

#### *Teste de Suscetibilidade às Drogas*

O zooterápico foi testado em associação com antibióticos e antifúngicos para verificar a ação dos mesmos frente a fungos e bactérias multirresistentes. A modulação das drogas foi realizada com base nos resultados da CIM, para isso foi necessário reduzir o produto a uma concentração subinibitória (CIM/8). Os medicamentos testados foram os antibióticos: Gentamicina, Neomicina e Amicacina, todos na concentração de 5000µg/mL; e os antifúngicos: Mebendazol, Anfotericina B, Nistatina e Benzoilmetronidazol na concentração de 1024µg/mL. Nas placas contendo o inóculo em BHI 10% com o ORJ<sub>E</sub> e somente inóculo em BHI 10% (controle), adicionou-se 100µL do medicamento para a diluição seriada. As

placas foram mantidas a 37°C durante 24h, quando seguiu a leitura dos resultados através da avaliação da turbidez e adição de resazurina (para fungos e bactérias, respectivamente).

### *Método Checkerboard*

Os melhores resultados observados na modulação foram testados novamente através do método checkerboard (Eliopoulos & Moellering, 1991), no qual foram combinadas as concentrações do antibiótico (inicial de 5000µg/mL) com as concentrações do ORJ<sub>E</sub> (inicial de 1024µg/mL). Para leitura dos resultados foi adicionado 20µL de resazurina e analisada a coloração após uma hora. O índice de Concentração Inibitória Fracionada (CIF) foi calculado com a soma de CIF<sub>A</sub> + CIF<sub>O</sub>, onde A representa antibiótico e O representa a substância teste, o ORJ<sub>E</sub>, conforme fórmula abaixo. Os parâmetros para interpretação do CIF são sinergismos quando menor que 0,5; aditividade quando entre 0,5 e 1,0; indiferença quando maior que 1,0; e antagonismo quando maior que 4,0.

$$CIF_A = \frac{CIM_A \text{ combinado}}{CIM_A \text{ sozinho}}$$

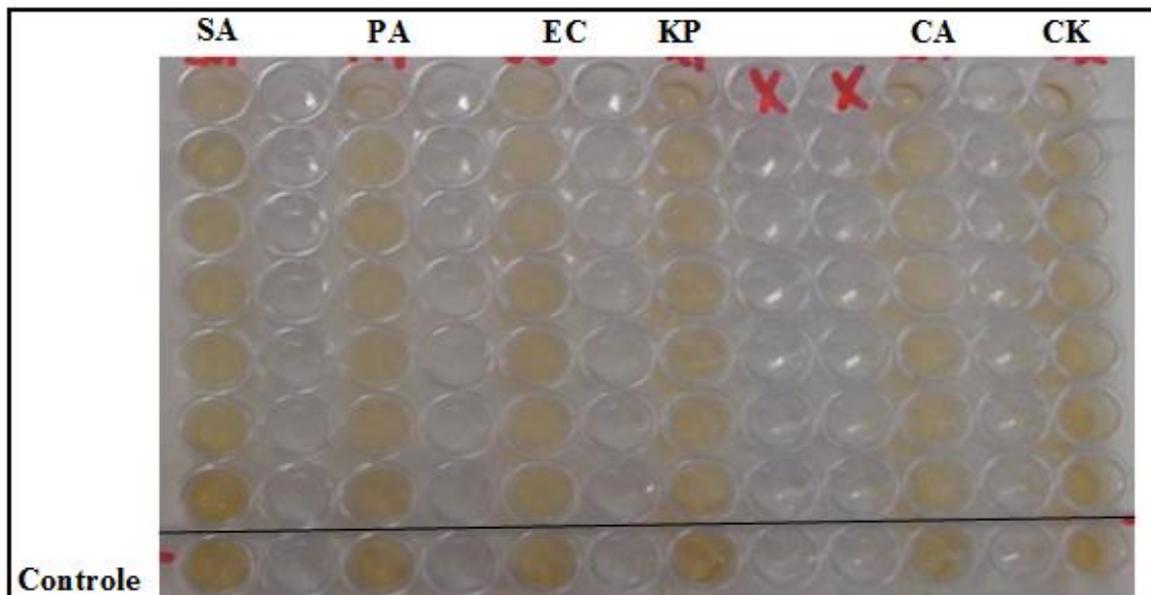
$$CIF_O = \frac{CIM_O \text{ combinado}}{CIM_O \text{ sozinho}}$$

## **Resultados e Discussão dos Ensaio Microbiológicos**

Após preparada a placa com o inóculo de cada microrganismo e feita a microdiluição em caldo de BHI (Figura 3), a placa é levada para estufa a 37°C por 24h. Com a aplicação de resazurina nas cavidades, e visualização de turbidez para fungos, verificou CIM de 512µg/mL para *Candida krusei* e CIM ≥ 1024µg/mL para todos os demais.

O resultado da CIM mostra que, embora tenha indicação no uso tradicional para infecções diversas (Ferreira *et al.*, 2009b, 2012; Costa-Neto & Alves, 2010), o ORJ quando aplicado sozinho não apresenta atividade antimicrobiana clinicamente relevante. Resultados

semelhantes foram obtidos do estudo de óleo de *Tupinambis merianae* (Ferreira *et al.*, 2009a), no entanto, quando avaliada a ação do ORJ combinada com amiglicosídeos, os resultados aqui (Tabelas 4 e 5) diferem dos obtidos para *T. merianae* cuja combinação não mostrou aumento da eficácia dos antimicrobianos.



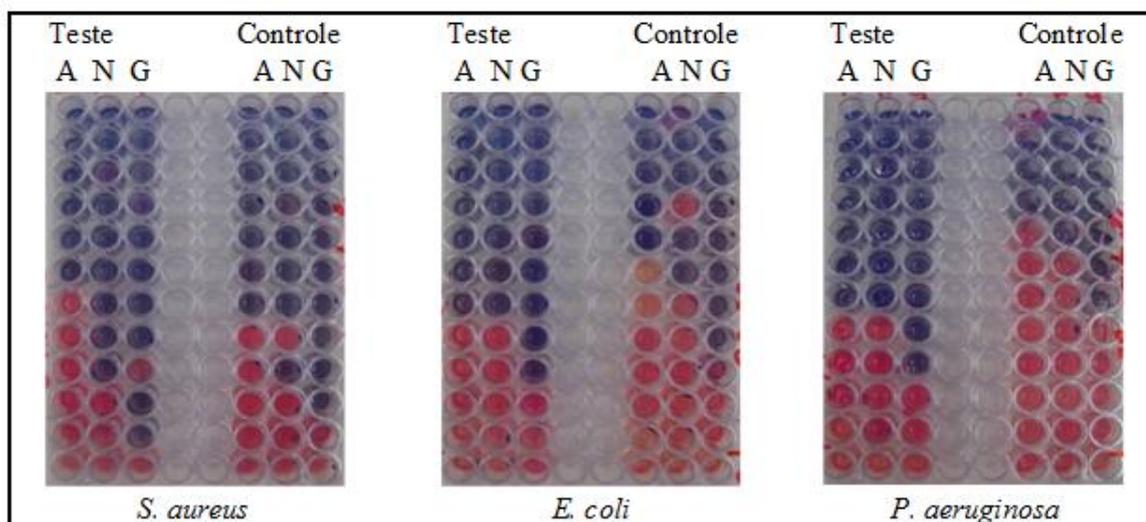
**Figura 3** - Placa de microdiluição preenchida com o inóculo e o ORJ<sub>E</sub> diluído em cada poço; Onde SA: *Staphylococcus aureus*; PA: *Pseudomonas aeruginosa*; EC: *Escherichia coli*; KP: *Klebsiella pneumoniae*; CA: *Candida albicans*; CK: *Candida krusei*. Foto da autora.

Na modulação por antibióticos (Tabela 4), agindo em *S. aureus*, o ORJ<sub>E</sub> não apresentou atividade de modulação. Para *E. coli* quando associada à amicacina, ORJ<sub>E</sub> mostrou-se eficaz ao reduzir quatro vezes a CIM em relação ao controle, dado indicativo de atividade sinérgica do mesmo. Da mesma forma com *P. aeruginosa* aliada a amicacina, gentamicina e neomicina, reduzindo oito, quatro e quatro vezes, respectivamente (Figura 4).

**Tabela 4** - Resultado do ORJ<sub>E</sub> utilizado como modulador da ação dos antibióticos microdiluídos, e o Controle, onde não foi utilizado o ORJ<sub>E</sub>, todos os resultados em µg/mL.

Antibióticos	<i>S. aureus</i> 358		<i>P. aeruginosa</i> 24		<i>E. coli</i> 27	
	ORJ <sub>E</sub>	Controle	ORJ <sub>E</sub>	Controle	ORJ <sub>E</sub>	Controle
Amicacina	78, 12	39, 06	39, 06	312, 50 *	39, 06	156, 25 *
Neomicina	9, 76	9, 76	39, 06	156, 25 *	39, 06	78, 12
Gentamicina	2, 44	4, 88	9, 76	39, 06 *	9, 76	19, 53

Nota: (\*) – Resultados mais expressivos.



**Figura 4** – Placas de microdiluição com resultados da modulação de antibióticos, uma hora após a aplicação de resazurina. Da esquerda para a direita *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Onde A – amicacina; N – neomicina; G – gentamicina. Fotos da autora.

Os tratamentos de escolha para infecções oportunistas por espécies de *Candida* são limitados e muitos antifúngicos existentes apresentam efeitos colaterais indesejáveis, ou podem induzir a resistência fúngica, principalmente em indivíduos imunodeprimidos (Fica, 2004) podendo causar desde infecções superficiais até infecções sistêmicas (Shao *et al.*, 2007).

Existem registros na literatura do uso de medicamentos industrializados associados a produtos naturais (Shin *et al.*, 2008; Calvet-Mir *et al.*, 2008; Vandebroek *et al.*, 2008), e

comprovação de produtos vegetais e animais alterando o efeito de medicamentos, aumentando ou reduzindo sua eficácia (Coutinho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2012a,b).

**Tabela 5** - Resultado do ORJ<sub>E</sub> utilizado como modulador da ação dos antifúngicos microdiluídos, e o Controle, onde não foi utilizado o ORJ<sub>E</sub>, todos os resultados em µg/mL.

Antifúngicos	<i>C. albicans</i> ICB 12		<i>C. krusei</i> ATCC6258	
	ORJ <sub>E</sub>	Controle	ORJ <sub>E</sub>	Controle
Mebendazol	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Anfotericina B	≥ 1024	≥ 1024	64 *	512 *
Nistatina	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Benzoilmetronidazol	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

Nota: (\*) – Resultados significativos.

Na Tabela 5 é possível observar os resultados da associação de ORJ<sub>E</sub> em concentração subinibitória (CIM/8) com os antifúngicos (Mebendazol, Anfotericina B, Nistatina e Benzoilmetronidazol) contra as linhagens de *Candida*. Para *C. albicans* não houve modulação, enquanto para *C. kusei*, o ORJ<sub>E</sub> reduziu oito vezes a CIM quando testado para Anfotericina B, indicando um efeito sinérgico do ORJ<sub>E</sub> com este antifúngico.

Segundo Granowitz & Brown (2008) é esperado um efeito antagonista devido ao uso combinado de antibióticos, provavelmente resultado de quelação dos mesmos, divergindo dos resultados aqui apresentados nos quais houve sinergismo, que corrobora com Nobre *et al.* (2002) e Agoramorthy *et al.* (2007), ao afirmar que os ácidos graxos podem ser capazes de inibir a atividade microbiana, sendo os insaturados mais eficazes nesse controle por afetarem a síntese bacteriana endógena de ácidos graxos (Zheng *et al.*, 2005), visto o percentual de insaturação de 55,39% apresentado no ORJ<sub>E</sub>.

Os resultados obtidos da modulação passaram ainda por uma segunda avaliação, na qual foi possível determinar com precisão o tipo de interação existente, nas possibilidades de indiferença, aditividade, sinergismo ou antagonismo. Como mostra a Tabela 6, os resultados da modulação foram confirmados. O ORJ<sub>E</sub> em associado à gentamicina causou um efeito aditivo (com índice de CIF 0,51) frente a *P. aeruginosa*, ainda com a mesma linhagem

bacteriana, apresentou ação indiferente quando testado com amicacina e neomicina, além de efeito sinérgico quando em associação à amicacina (com índice CIF 0,25) frente a *E. coli*.

**Tabela 4** – Resultado do *checkerboard*, do ORJ<sub>E</sub> com amicacina, gentamicina e neomicina, frente às bactérias multirresistentes *Escherichia coli* 27 e *Pseudomonas aeruginosa* 24, e o tipo de interação do ORJ<sub>E</sub> com os aminoglicosídeos.

	<i>E. coli</i> 27		<i>P. aeruginosa</i> 24	
	CIM	CIM combinada	CIM	CIM combinada
ORJ <sub>E</sub>	1024	4	1024	64
Amicacina	78,12	19,53	39,06	78,12
<b>CIF e Tipo de Interação</b>	<b>0,25 – Sinergismo</b>		<b>2,06 – Indiferença</b>	
ORJ <sub>E</sub>			1024	8
Gentamicina			39,06	19,53
<b>CIF e Tipo de Interação</b>			<b>0,51 – Aditividade</b>	
ORJ <sub>E</sub>			1024	16
Neomicina			39,06	39,06
<b>CIF e Tipo de Interação</b>			<b>1, 01 – Indiferença</b>	

Nota: CIM – Concentração Inibitória Mínima; ORJ<sub>E</sub> – Óleo de *Rhinella jimi* coletado em Exu - PE; CIF – Concentração Inibitória Fracionada.

# PARTE III

**Ensaio Farmacológicos**

### **PARTE III**

Abordagem dos ensaios farmacológicos dos óleos fixos de *Rhinella jimi* coletados em Exu – PE e Crato – CE (ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub>, respectivamente), que se deram através dos métodos de edema de orelha induzido por óleo de cróton (para avaliar o efeito tópico dos óleos em processos inflamatórios agudo e crônico); e edema de pata induzido por carragenina (para verificar o efeito sistêmico).

#### **Animais**

Foram utilizados camundongos albinos da espécie *Mus musculus*, adultos, de ambos os sexos, com pesos entre 20 e 30g, todos cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ). Os animais foram acondicionados em caixas de propileno, à temperatura média de 26°C e fotoperíodo de 12h, com água e ração (Labina, Purina®) à vontade.

#### **Análise anti-inflamatória através de edema de orelha**

##### *Edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton*

Grupos de oito animais tiveram as orelhas direitas pré-tratadas topicamente, recebendo 20µL de óleo fixo de *Rhinella jimi* (ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub>), solução salina 0,9% e dexametasona 4mg/mL para os grupos teste, controle negativo e controle positivo, respectivamente. Todas as aplicações foram distribuídas de maneira uniforme, sendo 10µL na face interna e 10µL na face externa da orelha (Figura 5). Passados quinze minutos para absorção, aplicou-se 20µL do óleo de cróton a 5% (v/v) em acetona na orelha direita e 20µL do veículo acetona na orelha esquerda. Após seis horas os animais foram sacrificados por decaptação e discos de 6mm de

diâmetro foram retirados de cada orelha com o auxílio de um cortador de couro metálico (*punch*) para avaliação do edema (Tubaro, 1985).



**Figura 5** – Aplicação na face interna da orelha. Foto da autora.

#### *Edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton*

Grupos contendo oito animais cada, tiveram um processo inflamatório crônico induzido pela aplicação de 20 $\mu$ L de óleo de cróton a 5% (v/v) em acetona na orelha direita em dias alternados, do primeiro ao nono dia de teste, conforme Tabela 7, que apresenta o cronograma do teste. O ORJ<sub>E</sub>, o ORJ<sub>C</sub>, a dexametasona 4mg/mL (controle positivo) e a solução salina 0,9% (cotrole negativo) foram aplicados por via tópica a partir do quinto dia do experimento, duas vezes ao dia, uma hora antes da aplicação do óleo de cróton (nos dias em que havia aplicação), seguindo da mesma forma até o nono dia. A orelha esquerda recebeu aplicação do veículo acetona sempre que aplicado o óleo de cróton na orelha direita. O edema teve avaliação diária através de medição da espessura das orelhas direita e esquerda com auxílio de um paquímetro digital. No nono dia do experimento, quatro horas após o último tratamento, os animais tiveram as espessuras das orelhas mensuradas, foram sacrificados em seguida e círculos de 6mm de tecido das orelhas foram coletados para avaliação do edema (Stanley *et al.*, 1991).

**Tabela 5:** Cronograma de execução do teste de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton, com horários e atividades realizadas durante os nove dias de avaliação.

	<b>Dias</b>	<b>1°</b>	<b>2°</b>	<b>3°</b>	<b>4°</b>	<b>5°</b>	<b>6°</b>	<b>7°</b>	<b>8°</b>	<b>9°</b>
7:00	Medição	X	X	X	X	X	X	X	X	X
8:00	Tratamento					X	X	X	X	X
9:00	Óleo de cróton	X		X		X		X		X
13:00	Medição	X	X	X	X	X	X	X	X	X
14:00	Tratamento					X	X	X	X	X
18:00	Medição									X
19:00	Sacrifício									X

Onde X representa os dias em que haverão as atividades listadas na coluna.

#### *Avaliação do edema de orelha*

Foram registradas as massas dos fragmentos da orelha direita (Mod) e da orelha esquerda (Moe) para o cálculo do percentual de inflamação dos diferentes grupos de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inflamação} = \left( \frac{\text{Mod} - \text{Moe}}{\text{Moe}} \right) \times 100$$

Já o cálculo do efeito inibitório médio da inflamação (EIM) deu-se aplicando a fórmula a seguir, onde  $MPE_{\text{trat}}$  (em %) é a média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento com ORJ<sub>E</sub>, ORJ<sub>C</sub>, ou fármaco padrão e  $MPE_{\text{cont}}$  (em %) é a média do percentual de edema do grupo controle negativo (tratado com salina), conforme:

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

Posterior a isso, foram calculados a média e o erro padrão da média (E.P.M.) dos percentuais de inflamação nos diferentes grupos e os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados com o teste *post hoc* de Student Newmann-Keuls ( $P < 0,05$ ) através do software GraphPad Prism 3.0.

### **Análise anti-inflamatória através de edema de pata**

Ratos machos ( $n = 5$ ), com massa corpórea entre 130-150g, da raça Wistar (*Rattus norvegicus*) foram utilizados nos ensaios biológicos. Os mesmos foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura controlada com livre acesso à água e ração a vontade.

O edema de pata foi induzido pela injeção de 150 $\mu$ L de carragenina (20% p/v) em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita dos ratos. O óleo de *Rhinella jimi* foi administrado por via intraperitoneal na dose de 300mg/kg, 1h antes da injeção de carragenina. Salina foi utilizada como controle.

Antes da aplicação da carragenina, foi realizada uma medida da pata direita para estabelecer o ponto inicial ( $T_0$ ) do tamanho da pata. Para avaliar o edema, 1 hora após a aplicação da carragenina foram realizadas sucessivas medidas ( $T_1$ ,  $T_2$ ,  $T_3$ ,  $T_4$ ) todas intercaladas por um intervalo de 1 hora. As medidas do tamanho das patas foram realizadas através do volume deslocado utilizando um plestismógrafo. A avaliação do edema (AEC) foi realizada através da diferença entre cada medida (feita após a aplicação da carragenina) com a medida  $T_0$  da pata (ex:  $AEC_1 = T_1 - T_0$ ;  $AEC_2 = T_2 - T_0$ ;  $AEC_3 = T_3 - T_0$ ;  $AEC_4 = T_4 - T_0$ ) (Winter *et al.*, 1962).

Posterior a isso, os percentuais de inflamação nos diferentes grupos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparar *post hoc* com o teste de Student-Newmann-Keuls ( $p < 0,05$ ) através do software GraphPad Prism 5.0

## Resultados e Discussão dos Ensaio Farmacológicos

O óleo de cróton extraído da planta *Croton tiglium*, tem como princípio irritante majoritário o TPA (13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol) (Lapa, 2003). A aplicação tópica de óleo de cróton induz uma resposta inflamatória cutânea caracterizada por vasodilatação e formação de eritema nas primeiras duas horas, seguido do aumento da espessura da orelha como resultado do extravasamento celular que atinge um pico máximo na sexta hora e tende a diminuir, atingindo os valores basais após 24h (Young *et al.*, 1983).

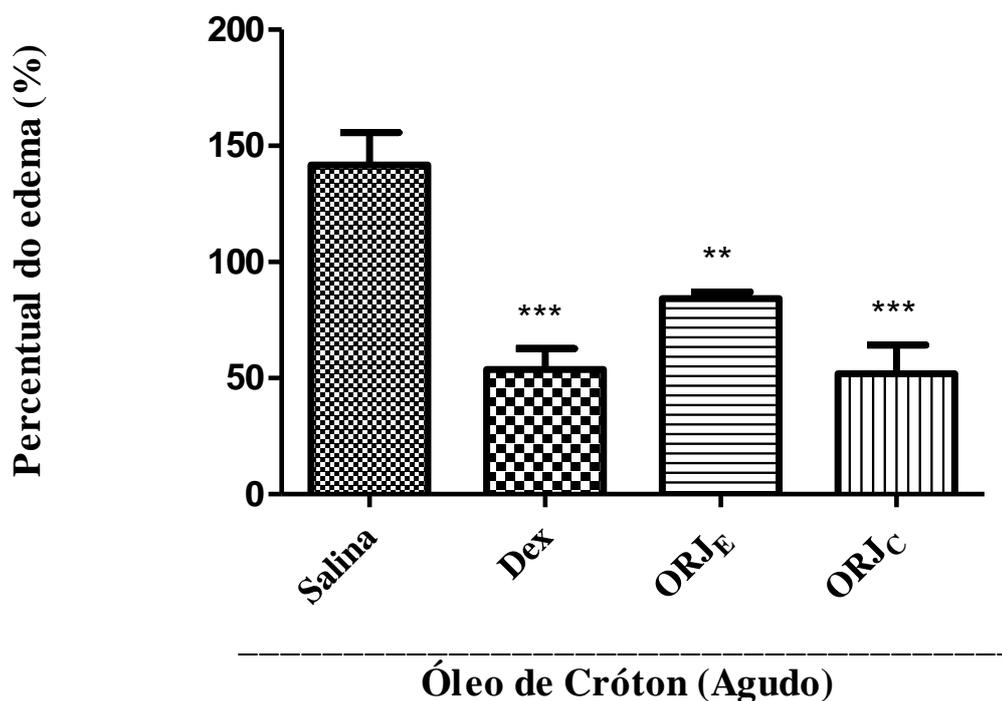
A aplicação única de óleo de cróton fornece dados quanto à atividade antiedematogênica de uma substância num processo inflamatório agudo, enquanto que a aplicação múltipla, em dias alternados, avalia a atividade antiedematogênica num processo inflamatório já estabelecido, com características semelhantes a uma inflamação crônica (Saraiva, 2009).

A Figura 6 mostra o resultado obtido da aplicação única de óleo de cróton em camundongos, com o efeito antiedematogênico após seis horas. Quando comparado com o grupo controle negativo, os grupos dexametasona (controle positivo), ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> demonstraram redução significativa do edema, tendo o grupo ORJ<sub>C</sub> efeito estatisticamente similar ao apresentado pelo grupo dexametasona. A Tabela 6 mostra o efeito inibitório médio de 40,62% (p<0,05) para ORJ<sub>E</sub>, de 63,35% (p<0,01) para ORJ<sub>C</sub> e de 62,1% (p<0,01) para a dexametasona.

**Tabela 6** - Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona, ORJ<sub>C</sub> e ORJ<sub>E</sub>.

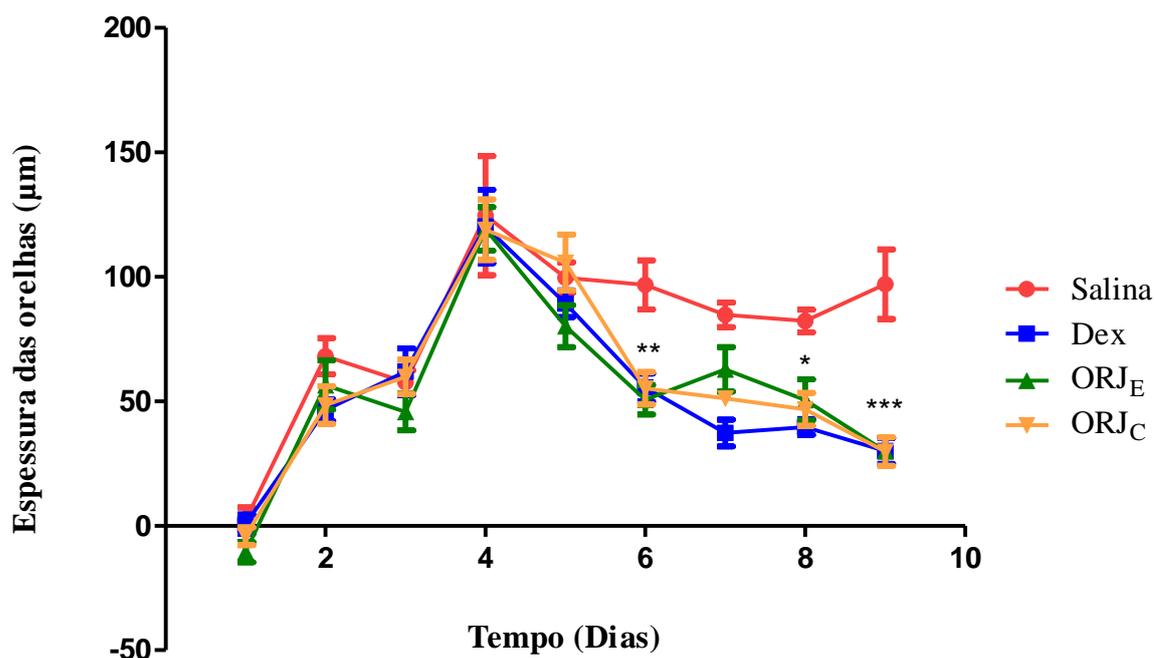
Tratamento	Óleo de cróton	
	Porcentagem do edema*	EIM (%)
Controle negativo	141,82 ± 13,9	-
Dexametasona	53,75 ± 9,0	62,1
ORJ <sub>C</sub>	51,99 ± 12,2	63,3
ORJ <sub>E</sub>	84,21 ± 2,9	40,6

Dados expressos em média ± erro padrão da média.



**Figura 6 - Efeito tópico dos óleos fixos de ORJ<sub>E</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu - Pernambuco) e ORJ<sub>C</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Crato - Ceará) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton (OC) em camundongos *Swiss*. Os animais foram pré-tratados com salina 0,9% (Controle), dexametasona (DEX), ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> e após 15 minutos, receberam topicamente solução de óleo de cróton 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 cróton. 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  $p < 0,05$  (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls).**

No tratamento crônico, conforme demonstrado na Figura 7, a aplicação tópica de ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> (2 vezes ao dia, durante 4 dias) na orelha dos camundongos promoveu uma diminuição significativa da espessura da orelha após cinco dias (96 horas) de aplicação do óleo de cróton, quando comparados ao grupo controle negativo, no qual alguns animais apresentaram necrose das orelhas tratadas. Quando comparados com a dexametasona (controle positivo), os grupos ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> não ficaram muito distantes, já que a dexametasona (0,08mg/orelha, 2 vezes ao dia, durante 4 dias) foi capaz de reduzir edema após 1, 2, 3 e 4 dias do início do tratamento. Os dados foram confirmados pela avaliação do percentual de edema no último dia do experimento conforme gráfico apresentado na figura 8 e dados expressos na tabela 7.



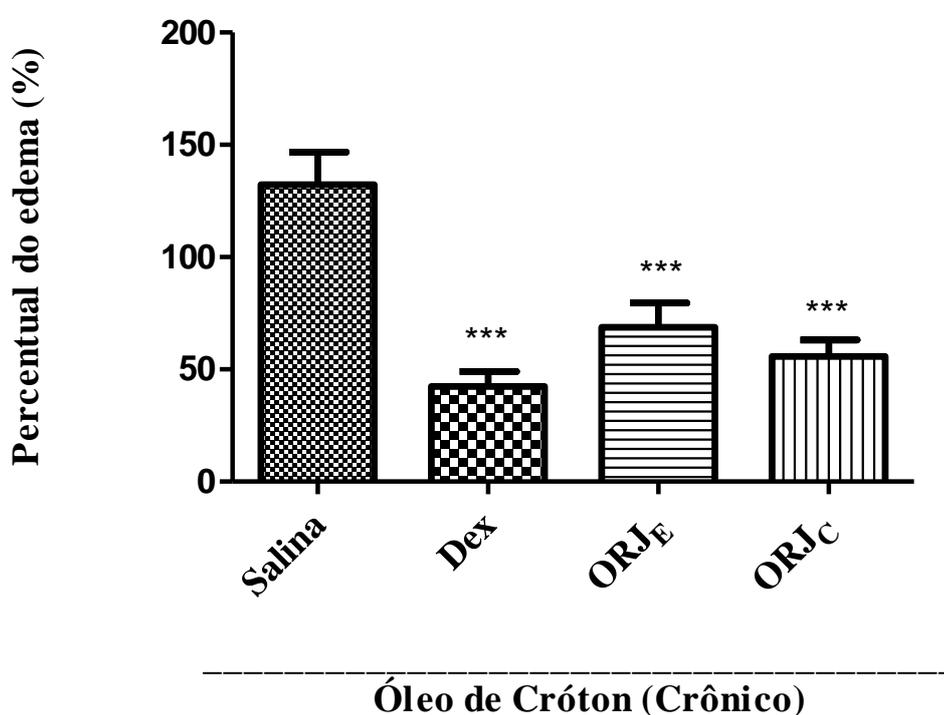
**Figura 7** - Curva tempo-resposta do efeito do ORJ<sub>E</sub> (Óleo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu - Pernambuco) e ORJ<sub>C</sub> (Óleo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Crato - Ceará) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos *Swiss*. 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 direita de cada animal recebeu veículo salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> bruto (20 µL, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 4 dias posteriores. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para  $P < 0,05$  (\* $p < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$  comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).

**Tabela 7** - Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona, ORJ<sub>C</sub> e ORJ<sub>E</sub>.

Tratamento	Óleo de cróton	
	Porcentagem do edema*	EIM (%)
<b>Controle negativo</b>	132,27 ± 14,5	-
<b>Dexametasona</b>	42,43 ± 6,6	67,92
<b>ORJ<sub>C</sub></b>	55,77 ± 7,2	57,8
<b>ORJ<sub>E</sub></b>	68,70 ± 10,8	48,1

Dados expressos em média ± erro padrão da média.

Estudos recentes observaram que os ácidos graxos podem atuar diretamente em processos inflamatórios (Das, 2008), agindo na resposta imunitária provocada por antígenos, e sendo em partes responsáveis pelos sintomas visíveis de inflamações (Griswold *et al.*, 1987). No entanto, numerosos trabalhos têm mostrado que os ácidos graxos demonstram atividade anti-inflamatória, apoiando a sua utilização para o tratamento de inflamações da pele (Calder, 2005; Das, 2006, 2008; Ferreira *et al.*, 2010).



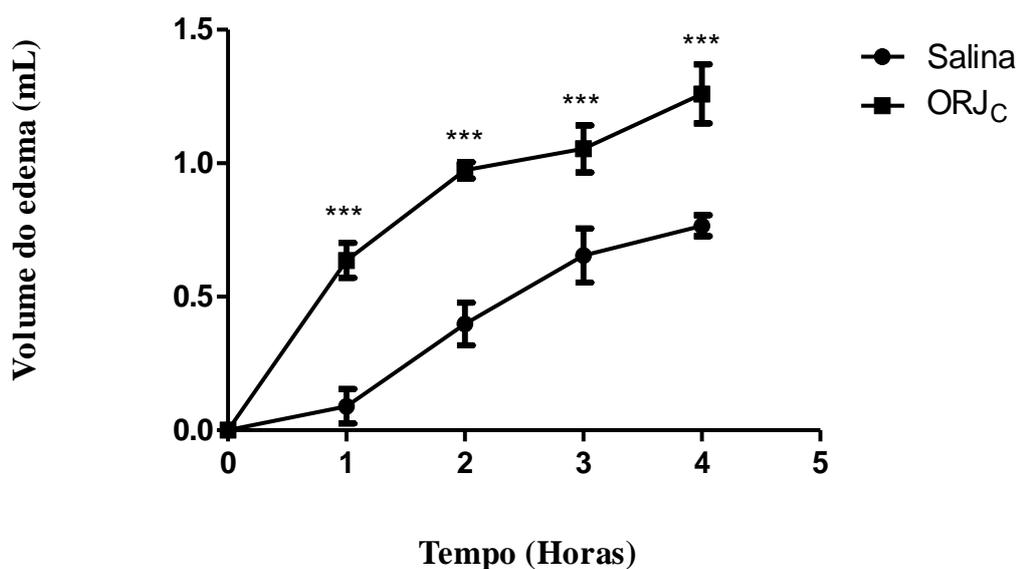
**Figura 8 - Efeito tópico dos óleos fixos de ORJ<sub>E</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Exu - Pernambuco) e ORJ<sub>C</sub> (Oléo fixo de *Rhinella jimi* coletado em Crato - Ceará) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos *Swiss*. A aplicação de OC foi conduzida em dias alternados, durante 9 dias. No 5º, 6º, 7º, 8º e 9º dias do experimento, a orelha direita de cada animal recebeu salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou ORJ<sub>E</sub> e ORJ<sub>C</sub> 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  $p < 0,05$  (\*\*\*)  $p < 0,001$  comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls).**

A gordura de *Rhinella jimi* é usada topicamente (como um tipo de creme ou loção) na medicina tradicional para tratar dores decorrentes de processos inflamatórios e infecções que

também geram essa resposta (Costa-Neto & Alves, 2010; Ferreira *et al.*, 2009b, 2012). Os resultados deste estudo indicam que a utilização tradicional da gordura de *R. jimi* tem suporte farmacológico, com base na redução da inflamação observada no modelo animal aqui usado.

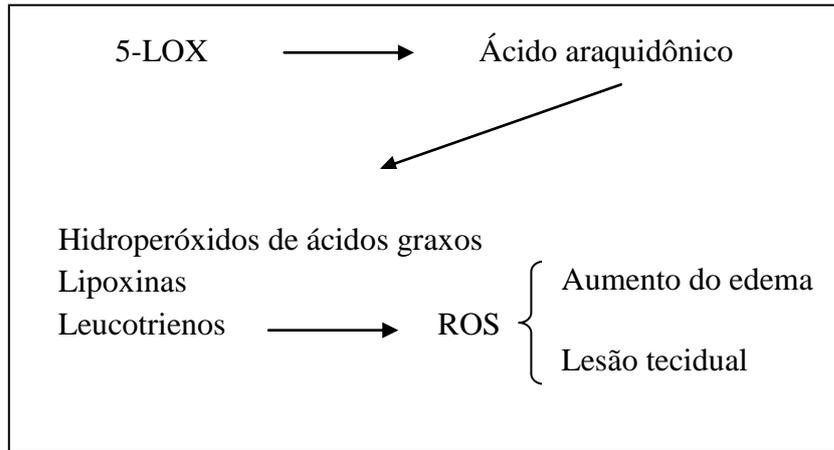
É observada uma diferença na resposta ao ORJ<sub>E</sub> e ao ORJ<sub>C</sub>, na qual o ORJ<sub>C</sub> reduziu de forma mais efetiva a inflamação no processo agudo, fato justificável pela composição química do ORJ<sub>C</sub> apresenta maior percentual de ácido linoleico, possível responsável pelo efeito anti-inflamatório, também encontrado em outros estudos (Ferreira *et al.*, 2010). Segundo Lowe & Stoughton (1977) o ácido linoleico aplicado topicamente possui capacidade de ser absorvido pelo estrato córneo, podendo em cinco dias restaurar a pele humana com vários distúrbios dermatológicos, como processos de cicatrização (Manhezi *et al.*, 2008).

O modelo de edema de pata é o mais utilizado para se avaliar o efeito anti-inflamatório de fármacos e insumos farmacêuticos. A administração de carragenina (1mg/pata a 0,1mL) nas patas de ratos induziu edema de forma gradual (Figura 9). A resposta edematogênica é um dos sinais da resposta inflamatória decorrente do aumento da permeabilidade vascular, que ocorre na microcirculação, devido à ação dos mediadores liberados. O modelo de edema de pata foi realizado apenas com ORJ<sub>C</sub>, devido resultado mais significativo encontrado no edema de orelha que simula inflamação aguda, no entanto, ORJ<sub>C</sub> não foi capaz de inibir o edema nos animais tratados, causando um efeito pró-inflamatório.



**Figura 9 - Curva tempo-resposta do efeito do ORJ<sub>c</sub> (tratamento por via intraperitoneal) sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*.** Os animais foram pré-tratados com veículo salina (controle negativo), ou ORJ<sub>c</sub> na dose 300 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 5 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).

Tal efeito pró-inflamatório apresentado pode ser atribuído à ação da enzima Lipoxigenase (LOX). Em processos inflamatórios pode haver uma desordem na liberação de citocinas e enzimas pró-inflamatórias (Krueger e Bawcock, 2006). Nesse modelo, conforme esquema mostrado na figura 10, a 5-LOX catalisa a biotransformação de ácido araquidônico e hidroperóxidos de ácidos graxos, lipoxinas e leucotrienos. Os leucotrienos irão induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que são essenciais para eliminar os microrganismos fagocitados, mas quando liberadas em meio extracelular podem causar aumento do edema e lesões teciduais (Kabeya, 2002).



**Figura 10** – Esquema representando a ação da 5-LOX sobre o ácido araquidônico e os efeitos causados.

Nos últimos anos os animais têm sido alvos de companhias farmacêuticas como fontes de substâncias para a produção de medicamentos (Harvey, 2008). Mesmo tendo os constituintes químicos e ações farmacológicas de alguns produtos de origem animal e suas utilidades terapêuticas já conhecidas (Pieron *et al.*, 2002), novas pesquisas etnofarmacológicas são necessárias para aumentar nossa compreensão das ligações entre os usos tradicionais dos recursos faunísticos e biologia da conservação, políticas de saúde pública, gestão sustentável dos recursos naturais, biológicos e de prospecção.

**CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

1. Em ambos os óleos foram identificados ésteres metílicos correspondentes a ácidos graxos variados, com predominância de ácidos da classe dos insaturados.
2. O óleo da banha de *Rhinella jimi* não apresentou efeito antimicrobiano, não sendo capaz de reduzir a Concentração Inibitória Mínima de bactérias e fungos.
3. Quando usado em associação com antimicrobianos o óleo modulou a ação de Anfotericina B para *C. krusei*. Para os antibióticos o óleo modulou a ação da amicacina de forma sinérgica para *Escherichia coli* 27; e de forma aditiva a gentamicina para *Pseudomonas aeruginosa* 24.
4. O óleo da gordura de *R. jimi* é eficaz em processos de inflamação tópica quando avaliado em processos agudos e crônicos., e ineficaz quando administrado intraperitonealmente.

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

- Adams, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.
- Agoramoorthy, G.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu., H. M. J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38: 739-742, 2007.
- Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, 47: 890-892, 1984.
- Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L. Kovats indices simulation in essential oils analysis. **Química Nova**, 13: 282-284, 1990.
- Alves, R. R. N. Animal-based remedies as complementary medicine in Brazil. **Research in Complementary Medicine**, 15: 226-227, 2008.
- Alves, R. R. N. Fauna used in popular medicine in Northeast Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 5:1, 2009.
- Alves, R. R. N.; Alves, H. N. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 7: 1-43, 2011.
- Alves, R. R. N.; Rosa, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 1:1-5, 2005.
- Alves, R. R. N.; Rosa I. L. From cnidarians to mammals: The use of animals as remedies in fishing communities in NE Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 107: 259-76, 2006.
- Alves, R. R. N.; Rosa, I. L. Biodiversity, traditional medicine and public health: where do they meet? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 3: 1-9, 2007a.
- Alves R. R. N., Rosa I. L. Zotherapy goes to town: The use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. **Journal of Ethnopharmacology** 113: 541-555, 2007b.
- Alves, R. R. N.; Rosa, I. L. Zotherapeutic practices among fishing communities in North and Northeast Brazil: comparison. **Journal of Ethnopharmacology** 111: 82-103, 2007c.
- Alves, R. R. N.; Vieira, W. L. S.; Santana, G. G. Reptiles used in traditional folk medicine: conservation implications. **Biodiversity and Conservation**, 7: 2037-2049, 2007a.
- Alves, R. R. N.; Rosa, I. L.; Santana, G. G. The role of animal-derived remedies as complementary medicine in Brazil. **BioScience**, 57: 949-955, 2007b.

Alves, R. R. N.; Vieira, W.L.S.; Santana, G. G.; Vieira, K.S.; Montenegro, PFG. Herpetofauna Used in Traditional Folk Medicine: Conservation Implications. In: R. R. N. Alves, I. L. Rosa.. (Org.). **Animals in Traditional Folk Medicine: Implications for Conservation. Animals in Traditional Folk Medicine: Implications for Conservation.** Berlin: Springer-Verlag, p. 109-133, 2012a.

Alves, R. R. N.; Vieira, K. S.; Santana, G. G.; Vieira, W. L. S.; Almeida, W. O.; Souto, W. M. S.; Montenegro, P. F. G. P.; Pezzuti, J. C. B. A review on human attitudes towards reptiles in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, 184: 1-25, 2012b.

Araújo, J. C. L. V.; Lima, E. O.; Ceballos, B. S. O.; Freire, K. R. L.; Souza, E. L.; Santos Filho, L. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, 33: 55-64, 2004.

Barros, F. B. **Sapos e seres humanos: uma relação de preconceitos?** Programa de Pós-Graduação em Agricultras Amazônicas, Universidade Federal do Pará, 2005.

Bernarde, P. S.; Santos, R. A. Utilização medicinal da secreção (“vacina-do-sapo”) do anfíbio kambô (*Phyllomedusa bicolor*) (Anura: Hylidae) por população não-indígena em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. **Biotemas**, 22: 213-220, 2009.

Bopp, C. A. et al. Escherichia, Shigella and salmonella. In: Murray PR. **Manual of clinical microbiology.** ASM Press Washington, DC, 7ed. p. 459-465, 1999.

Brito, S. V.; Ferreira, F. S.; Siqueira-Junior, J. P.; Costa, J. G. M.; Almeida, W. O.; Coutinho, H. D. M. Phototoxic and modulatory effects of natural products from the skin of *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 22: 82-87, 2012a.

Brito, S. V.; Sales, D. L.; Costa, J. G. M.; Rodrigues, F. F. G.; Ferreira, F. S.; Angelico, E. C.; Carvalho, J. E.; Almeida, W. O.; Anjos, L. A.; Coutinho, H. D. M. Investigation of the cytotoxic potential of *Rhinella jimi* skin methanol extracts. **Pharmaceutical Biology**, 50: 1026-1030, 2012b.

Burbach, G. J.; Ansel, J. C.; Armstrong, C. A. Cytokines in the skin. In: **The Biology of the Skin.** The New York: Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.

But, P. P. H.; Tam, Y. K.; Lung, L. C. Ethnopharmacology of rhinoceros horn. II antipyretic effects of prescriptions containing rhinoceros horn and water buffalo horn. **Journal of Ethnopharmacology**, 33: 45–50, 1991.

Calder, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Inflammation and Haemostasis.** 33: 423-427, 2005.

Calvet-Mir, L.; Reyes-García, V.; Tanner, S. Is there a divide between local medicinal knowledge and Western medicine? A case study among native Amazonians in Bolivia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 4:18, 2008.

Carvalho, J. C. T. Constituintes de plantas com atividade antiinflamatória. In: **Fitoterápicos antiinflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. São Paulo: Tecmedd, 2004.

Collins, T. Acute and chronic inflammation. In: Contran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T.; Robbins. **Pathologic basis of disease**, Philadelphia: WB Saunders Company, 1999.

Costa-Neto, E. M. Faunistic resources used as medicines by an Afro-brazilian community from Chapada Diamantina National Park, state of Bahia-Brazil. **Sitientibus**, 15: 211-219, 1996.

Costa-Neto, E. M. Animal based medicines biological prospection and the sustainable use of zootherapeutic resources. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 77: 133-43, 2005.

Costa-Neto, E. M.; Alves, R. R. N. **Zooterapia: os animais na medicina popular brasileira**. Recife: NUPEEA, 2010.

Costa-Neto, E. M.; Oliveira, M. V. M. Cockroach is good for asthma: zootherapeutic practices in northeastern Brazil. **Human Ecology Review**, 7: 41-51, 2000.

Costa-Neto, E. M.; Pacheco, J. M. A construção do domínio etnozoológico “inseto” pelos moradores do povoado de Pedra Branca, Santa Terezinha, estado da Bahia. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 26: 81-90, 2004.

Costa-Neto, E. M.; Resende, J. J. A percepção de animais como “insetos” e sua utilização como recursos medicinais na cidade de Feira de Santana, Estado da Bahia, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, 26: 143-149, 2004.

Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. (Trad. Barbosa, J. B.; De Vasconcelos, M. M.; Voeux, P. J.). **Patologia Estrutural e Funcional**, 6ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

Coutinho, H. D. M.; Cordeiro, L. N.; Bringel, K. P. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from the population of Juazeiro do Norte – Ceará. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, 9: 127-138, 2005.

Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G. M.; Siqueira-Júnior, J. P.; Lima, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptis martiusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 670-675, 2008.

Coutinho, H. D. M., Costa, J. G. M., Siqueira-Júnior, J. P.; Lima, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 33: 467-71, 2010.

Daly, J. W. Thirty years of discovering arthropod alkaloids in amphibian skin. **Journal of Natural Products**, 61: 162-172, 1998.

Daly, J. W.; Caceres, J.; Moni, R. W.; Gusovsky, F.; Moos Júnior, M.; Seamon, K. B.; Milton, K.; Myers, C. W. Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: Identification of a peptide that interacts with an adenosine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 89: 10960-10963, 1992.

Daly, J. W.; Noimai, N.; Kongkathip, B.; Kongkathip, N.; Wilham, J. M.; Garrafo, H. M.; Kaneko, T.; Spande, T. F.; Nimit, Y.; Nabhitabhata, J.; Chan-Ard, T. Biologically active substances from amphibians: preliminary studies on anurans from twenty-one genera of Thailand. **Toxicon**, 44: 805-815, 2004.

Das, U. N. Essential Fatty Acids - A Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. 7: 3-19, 2006.

Das, U. N. Essential fatty acids and their metabolites could function as endogenous HMG-CoA reductase and ACE enzyme inhibitors, anti-arrhythmic, antihypertensive, anti-atherosclerotic, anti-inflammatory, cytoprotective, and cardioprotective molecules. **Lipids in Health and Disease**, 7: 37, 2008.

De Backer, D.; Christiaens, T.; De Sutter, A.; Stobberingh, E.; Verschraegen, G. Evolution of bacterial susceptibility pattern of *Escherichia coli* in uncomplicated urinary tract infections in a country with high antibiotic consumption: a comparison of two surveys with a 10 year interval. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 62: 364-368, 2008.

Descola, P. Estrutura ou sentimento: a relação com o animal na Amazônia. **Mana**, 4: 23-45, 1998.

Deurenberger, R. H.; Vink, C.; Kalenic, S.; Friedrich, A. W.; Bruggeman, C. A.; Stobberingh, E. E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, 13: 222-235, 2007.

Digard, J. P. Un aspect méconnu de l'histoire de l'Amérique: La domestication des animaux. **L'Homme**, 32: 253-270, 1992.

Dorcas, M. E.; Colledge, D. Amphibians and reptiles: conservation of our natural heritage. Part of the Science in North Carolina Series. **The North Carolina Academy of Science**, 2008.

Drews, C. Attitudes, knowledge and wild animals as pets in Costa Rica. **Anthrozoos**, 15: 119-138, 2002.

Duellman, W. E.; Trueb, L. **Biology of Amphibians**. McGraw Hill Book Co., New York, USA, 577p. 1994.

Eliopoulos, G. M.; Moellering, R. C. Antimicrobial combinations. In: Lorian V, editor. **Antibiotics in laboratory medicine**. Baltimore: MD, 434-41, 1991.

Elisabetsky, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, 55: 35-36, 2003.

Falodun, A.; Owolabi, O. J.; Osahon, O. Physicochemical, antimicrobial and anti-inflammatory evaluation of fixed oil from *Boa constrictor*. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, 65: 477-480, 2008.

Ferreira, F. S.; Brito, S. V.; Costa, J. G. M.; Alves, R. R. N.; Coutinho, H. D. M.; Almeida, W. O. Is the body fat of the lizard *Tupinambis merianae* effective against bacterial infections? **Journal of Ethnopharmacology**, 126: 233-237, 2009a.

Ferreira, F. S.; Brito, S. V.; Ribeiro, S. C.; Almeida, W. O.; Alves, R. R. N. Zootherapeutics utilized by residents of the community Poco Dantas, Crato-CE, Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 5: 21, 2009b.

Ferreira, F. S.; Brito, S. V.; Saraiva, R. A.; Araruna, M. K. A.; Menezes, I. R. A.; Costa, J. G. M.; Coutinho, H. D. M.; Almeida, W. O.; Alves, R. R. N. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merinae*. **Journal of Ethnopharmacology**, 130: 514-520, 2010.

Ferreira, F. S.; Silva, N. L. G.; Matias, E. F. F.; Brito, S. V.; Oliveira, F. G.; Costa, J. G. M.; Coutinho, H. D. M.; Almeida, W. O.; Alves, R. R. N. Potentiation of aminoglycoside antibiotic activity using the body fat from the snake *Boa constrictor*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 21: 503-509, 2011.

Ferreira, F. S.; Albuquerque, U. P.; Coutinho, H. D. M.; Almeida, W. O.; Alves, R. R. N. The trade in medicinal animals in northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1-20, 2012. Doi:10.1155/2012/126938.

Fica, C. A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistêmicas. Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista Chilena de Infectologia**, 21: 26-38, 2004.

Firestein, G. S. **Mechanisms of inflammation and tissue repair**. Goldman, L. e Ansello, D. Textbook of Medicine, 22ed., p. 227, 2004.

Fleck, D. W.; Harder, J. D. Matses Indians rainforest habitat classification and mammalian diversity in Amazonian Peru. **Journal of Ethnobiology** 20: 1-36, 2000.

Freitas, F. I.; Guedes-Stehling, E.; Siqueira-Júnior, J. P. Resistance to gentamicin and related aminoglycosides in *Staphylococcus aureus* isolated in Brazil. **Letters Applied Microbiology**, 29: 197-201, 1999.

Funtowicz, S.; Ravetz, F. Science for the post-normal age. **Future**, 25: 735-755, 1993.

Gibbons, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural product reports**, 126: 263-277, 2004.

Golan, D. E.; Tashjian-Jr, A. H.; Armstrong, E. J.; Armstrong, A. W. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatologica da farmacoterapia**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

Goldim J. R.; Raymundo, M. M. **Pesquisa em Modelos Animais**, 2008. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/animrt.htm>>. Acesso em: 22 de junho de 2012.

Granowitz, E. V.; Brown, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, 24: 421-442, 2008.

Griswold, D. E.; Webb, E.; Schwartz, L.; Hanna, N. Arachidonic acid-induced inflammation: Inhibition by dual inhibitor of arachidonic acid metabolism, SK&F 86002. **Inflammation**, 11: 189-199, 1987.

- Gunthorsdottir, A. Physical attractiveness of an animal species as a decision factor for its preservation. **Anthrozoos**, 14: 204-215, 2001.
- Hartman, L.; Lago, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, 22: 475-477, 1973.
- Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. 13: 894-901, 2008.
- Hayes, T. B.; Falso, P.; Gallipeau, S.; Stice, M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's Perspective. **The Journal Experimental Biology**, 213:921-933, 2010.
- Henderson, J.; Harrington, J. P. Ethnzoology of the Tewa Indians. **Bureau of American Ethnology Bulletin**, 56: 1-76, 1914.
- Javadpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal Medical Chemistry**, 39: 3107-3113, 1996.
- Kabeya, L.M. **Estudo do efeito de cumarinas simples no metabolismo oxidativo de neutrófilos de coelho: aspectos metodológicos, avaliação da atividade e da sua relação com a toxicidade e com propriedades físico-químicas dos compostos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, 2002.
- Keith, C. T.; Borisy, A. A.; Stockwel, B. R. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Revista Drug Discovery**, 4: 71-78, 2005.
- Krueger, J.G.; Bawcock, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annual Rheumatic diseases**, 64:30-36, 2006.
- Lapa, A. J.; Souccar, C. S.; Lima-Landman, M. T. R.; Castro, M. S. A.; Lima, T. C. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais. Porto Alegre: Metrópole, 2003.
- Lauck, J. E. **The voice of the infinite in the small: revisioning the insect-human connection**. Boston: Shambhala Publications, 2002.
- Lev, E. Traditional healing with animals (zootherapy): medieval to present-day Levantine practice. **Journal of Ethnopharmacology**, 85:107-118, 2003.
- Lewis, I. M. The spider and the pangolin. **Mana**, 26: 513-525, 1991.
- Lowe, N. J.; Stoughton, R. B. Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. **The British Journal of Dermatology**, 96: 155-162, 1977.
- Luciano, E. P.; Ribeiro, M. F. I.; Torres, T. M. et al. Análise retrospectiva de infecções do trato urinário, estudo epidemiológico de cinco anos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 414-457, 2004.

Macgowan, P. A. Clinical implications of antimicrobial resistance for therapy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 62: 105-114, 2008.

Manhezi, A. C.; Bachion, M. M.; Pereira, A. L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, 61: 620-629, 2008.

Marques, J. G. W. O olhar (des)multiplicado. O papel do interdisciplinar e do qualitativo na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. In: Amorozo, M. C. M.; Mingg, L. C.; Silva, S. M. P. (eds.). **Métodos de coleta e análise de dados em etnobiologia, etnoecologia e disciplinas correlatas**. UNESP/CNPq, Rio Claro, p.31-46, 2002.

Martins, V. S.; Souto, F. J. B. Uma análise biométrica de bivalves coletados por marisqueiras no manguezal de Acupe, Santo Amaro, Bahia: uma abordagem etnoconservacionista. **Sitientibus**, 98-105, 2006.

Mason, O. T. Aboriginal American zootechny. **American Anthropologist**, 1: 45-81, 1899.

McCue, M. D.; Fatty acid analyses may provide insight into the progression of starvation among squamate reptiles. **Comparative Physiology and Biochemistry**, 151: 239– 246, 2008.

Mcdonald, D. M.; Thurston, G.; Baluk, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. **Microcirculation**, 6: 7-22, 1999.

Mebs, D.; Omori-Satoh, T.; Tamakawa, Y.; Nagaoka, Y. Erinacin, an antihemorrhagic factor from the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. **Toxicon**, 34: 1313 – 1316, 1996.

Melo-Júnior, C. A. R. **Esterificação catalítica e não-catalítica para síntese de biodiesel em reator microondas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos). Departamento de Engenharia Química, Universidade Tiradentes – UNIT, 2008.

Monti, R.; Cardello, L. Bioquímica do veneno de anfíbios. In: Barraviera, B. (Ed.). **Venenos: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. EPUB, Rio de Janeiro, Brasil, p.225-232, 1999.

Moreira, N. X.; Curi, R.; Mancini Filho, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, 24: 105-23, 2002

Mota, R. A.; Silva, K. P. C.; Freitas, M. F. L.; Porto, W. J. N.; Silva, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. Artigo de revisão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 42: 465-470, 2005.

Motta, R. Le sacrifice Xangô à Recife. **Social Compass**, 50: 229-246, 2003.

Mourão, J. S. Araújo, H. F. P.; Almeida, F. S. Ethnotaxonomy of mastofauna as practised by hunters of the municipality of Paulista, state of Paraíba- Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 2: 7, 2006.

Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Kobayashi, G. S; Pfaller, M. A. **Microbiologia Médica**. 4ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2004.

Nobre, M. O.; Nascente, P. S.; Meireles, M. C.; Ferreiro, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, 32: 175-184, 2002.

Nostro, A.; Blanco, A. R.; Cannatelli, M. A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, 230: 191-5, 2004.

Overall, W. L. Introduction to ethnozoology: what it is or could be. In: Posey, D. A. & Overall, W. L. (orgs.). **Ethnobiology: implications and applications**. MPEG, Belém, Brasil, p.127-129, 1990.

Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 2720-2722, 2002.

Pessoa, R. S.; Almeida, A. V.; Alves, A. G. C.; Melo, L. E. H. A “maçã-do-boi” (bezoário): etnomedicina, história e ciência. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, 2: 55-61, 2002.

Pieroni, A.; Quave, C.; Nebel, S.; Heinrich, M. Ethnopharmacy of the ethnic Albanians (Arbëreshë) of northern Basilicata, Italy. **Fitoterapia**, 73: 217-241, 2002.

Pimenta, B. V. S.; Haddad, C. F. B.; Nascimento, L. B.; Cruz, C. A. G.; Pombal Jr, J. P. Comment on “status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide”. **Science**, 309, 2005.

Portillo, A.; Vila, R.; Freixa, B.; Adzet, T.; Cañigüeral, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 76: 93-98, 2001.

Posey, D. A. Temas e inquirições em etnoentomologia: algumas sugestões quanto à geração de hipóteses. **Boletim Museu Paraense Emílio Göeldi**, 3: 99-134, 1987.

Proksch, E.; Brandner, J. M.; Jensen, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, 17: 1063-1072, 2008.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J. **Farmacologia**. 6ed. Trad.: Raimundo Rodrigues Santos [et al]. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

Rates, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, 39: 603-613, 2001.

Ricklefs, E. R. **A economia da natureza**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanbara Koogan, 2009.

Rossi, F.; Andreazzi, D. B. **Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma**. 1ed. São Paulo: Atheneu, p.118, 2005.

Saccaro Jr, N. L. **Desafios da Bioprospecção no Brasil**. Brasília: IPEA, 2011.

Salvat, A. A.; Antonnacci, L.; Fortunato, R. H.; Suarez, E. Y. Screening of some plants from northern Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**, 32: 293-297, 2001.

Santos-Fita, D.; Costa-Neto, E. M. As interações entre os seres humanos e os animais: a contribuição da etnozoologia. **Biotemas**, 20(4): 99-110, 2007.

Santos, I. J. M.; Matias, E. F. F.; Santos, K. K. A.; Braga, M. F. B. M.; Andrade, J. C.; Souza, T. M.; Santos, F. A. V.; Sousa, A. C. A; Costa, J. G. M.; Menezes, I. R. A.; Alves, R. R. N.; Almeida, W. O.; Coutinho, H. D. M. Evaluation of the antimicrobial activity of the decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus semitaeniatus* (Spix, 1825) used by the traditional medicine. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012a.

Santos, I. J. M.; Coutinho, H. D. M.; Matias E. F. F.; Costa, J. G. M.; Alves, R. R. N.; Almeida, W. O. Antimicrobial activity of natural products from the skins of the semiarid living lizards *Ameiva ameiva* (Linnaeus, 1758) and *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825). **Journal of Arid Environments**, 76: 138-141, 2012b.

Saraiva, R. A. **Efeito anti-inflamatório do óleo fixo de mesocarpo interno de *Caryocar coriaceum* Wittm. em edemas induzidos por agentes flogísticos em modelos animais.** Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri – URCA, 2009.

Scarpa, A. Pre-scientific medicines: their extent and value. **Society of Science Medicine**, 15A:317-326, 1981.

Schunurrenberger, P. R.; Hubbert, W. T. **An outline of the zoonoses.** Ames, Iowa State University Press, 1981.

Shao, P. L.; Huang, L. M.; Hsueh, P. R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 30: 487–495, 2007.

Shin, S.; Pyun, M. Anti-candid effects of estragole in combination with ketaconazole or amphotericin B. **Phytoterapy**, 18: 827-830, 2004.

Shin, Y.; Yang C.; Joo, M.; Lee, S.; Kim, J.; Lee, M. Patterns of using complementary and alternative medicine by stroke patients at two University Hospitals in Korea. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 5: 231–235, 2008.

Smith, R. C. Hallucinations of insect infestation causing annoyance to man. **Bulletin of the Brooklyn Entomological Society**, 29: 208-210, 1934.

Souto, F. J. B. Uma abordagem etnoecológica da pesca do caranguejo, *Ucides cordatus*, Linnaeus, 1763 (Decapoda: Brachyura), no manguezal do Distrito de Acupe (Santo Amaro-BA). **Biotemas**, 20: 69-80, 2007.

Sousa, E. O.; Silva, N. F.; Rodrigues, F. F. G.; Campos, A. R.; Lima, S. G.; Costa, J. G. M. Chemical compositi and resistance modifying effect of *Lantana camara* lin. **Pharmacognosy magazine**, 6: 79-82, 2010.

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**, 4: 1991.

Stenhagen, E.; Abrahamson, S.; McLafferty, F. W. **Registry of Mass Spectra Data Base**. Washington DC: Government Printing Office, 1974.

Stevaux, M. N. The new species of *Bufo* (Anura, Bufonidae) in the Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 19: 235-242, 2002.

Still, J. Use of animal products in traditional Chinese medicine: environmental impact and health hazards. **Complementary Therapies in Medicine**, 11: 118–122, 2003.

Stuart, S. N.; Chanson, J. S.; Cox, N. A.; Young, B. E.; Rodrigues, A. S. L.; Fischman, D. L.; Waller, R. W. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. **Science**, 306: 1783–1786, 2004.

Swartz, M. M. Impact of antimicrobial agents and chemotherapy from 1972 to 1998. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 44: 2009-2016, 2000.

Tavares, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. 2ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

Tavares, W. Aminociclitolis aminoglicosídeos. In: Tavares, W. ed. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. São Paulo: Atheneu, p. 573-626, 2001.

Tempone, A. G.; Pimenta, D. C.; Lebrun, I.; Sartorelli, P.; Taniwaki, N. N.; Andrade J. R. H. F.; Antoniazzi, M. M.; Jared, C. Antileishmanial and antitrypanosomal activity of bufadienolides isolated from the toad *Rhinella jimi* paratoid macrogland secretion. **Toxicon**, 52: 13-21, 2008.

Toledo, V. M.; Barrera-Bassols, N. **La memória biocultural: La importância ecológica de las sabidurías tradicionales**. Barcelona: Icaria editorial, 2008.

Toledo, V. M.; Barrera-Bassols, N. A etnoecologia: uma ciência pós-normal que estuda as sabedorias tradicionais. In: Silva, V.A.; Almeida, A.L.S.; Albuquerque, U.P. **Etnobiologia e etnoecologia: pessoas e natureza na América Latina**. Recife: Nupeea, 2010.

Tortora, G. J.; Funke, B. R.; Case, C. L. **Microbiologia**, 8ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.

Tubaro, A.; Dri, P.; Delbello, G.; Zilli, C.; Della-Loggia, R. The croton oil test revisited. **Agents Actions**, 17: 347-349, 1985.

Vandebroek, I.; Thomas, E.; Sanca, S.; et al. Comparison of health conditions treated with traditional and biomedical health care in a Quechua community in rural Bolivia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 4:1, 2008.

Varaldo, P. E. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. **Journal of Antibacterial Chemotherapy**, 50: 1-4, 2002.

Verhoeff, J.; Beaujean, D.; Vlok, H.; Baars, A.; Meyler, A.; Werkwn, V. D. C. A dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 18: 461-466, 1999.

Winter, C. A.; Risley, E. A.; Nuss, G. W. Carrageenan induced oedema in hind paw as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings Society for Experimental Biology and Medicine**, 111: 544-547, 1962.

Young, J. M.; Wagner, B.; Spires, D. A. Tachyphylaxis in 12-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid ear edema. **Journal of Investigative Dermatology**, 80: 48-52, 1983.

Zang, F. X.; Guo, B. Z.; Wang, H. Y. The spermatocidal effects of earthworm extract and its effective constituents. **Soil Biology and Biochemistry**, 24: 1247 – 1251, 1992.

Zhang, Z.; Elsohly, H. N.; Jacob, M. R.; Pasco, D. S.; Walker, L. A.; Clark, A. M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. **Planta Medica**, 68: 49-54, 2002.

Zheng, C. J.; Yoo, J. S.; Lee, T. G.; Cho, H. Y.; Kim, Y. H.; Kim, W. G. Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, 579: 5157–5162, 2005.

**ANEXOS**

I-



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27486-1	Data da Emissão: 21/03/2011 10:02
Dados do titular	
Nome: Débora Lima Sales	CPF: 021.698.813-60
Título do Projeto: Análise microbiológica e farmacológica do óleo fixo da banha de Rhinella jimi (Slevaux, 2002) (Anura: Bufonidae) na Região do Cariri cearense	
Nome da Instituição: Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Trabalho de campo - coleta dos espécimes	05/2011	07/2011
2	Identificação dos espécimes	06/2011	07/2011
3	Preparação dos extratos metanólicos	07/2011	10/2011
4	Realização dos testes microbiológicos	10/2011	02/2012
5	Realização dos testes farmacológicos	01/2012	04/2012

De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

#### Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anulações previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte <a href="http://www.icmbio.gov.br/sisbio">www.icmbio.gov.br/sisbio</a> - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexplotação.

#### Outras ressalvas

1	1) pit-falls devem ser retiradas/fechadas quando não houverem trabalhos. Quando ativas, devem conter aparatos contra insolação e/ou afogamento dos animais. A equipe é responsável pela inspeção, no início e fim de cada dia de trabalho para que indivíduos capturados, de taxa não contemplados, sejam soltos em bom estado de saúde. 2) Esta autorização também a atividade 'Captura de animais silvestres in situ', já que tal ação é pré-requisito para a COLETA (retirada definitiva do animal da natureza).
---	---

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Samuel Vieira Brito	Coleta e transporte dos espécimes animais	936.212.303-78	3338160.98 SSP-CE	Brasileira
2	JOSÉ GUILHERME GONÇALVES DE SOUSA	Coleta e transporte dos espécimes animais	030.444.143-00	2004034084316 SSP-CE	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 62956869



Página 1/3

II-



FUNDAÇÃO EDSON QUEIROZ  
UNIVERSIDADE DE FORTALEZA  
ENSINANDO E APRENDENDO

UNIVERSIDADE DE FORTALEZA  
VICE-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA

**PARECER N.º. 006/2011**

**Projeto de Pesquisa:** Análise microbiológica e farmacológica do óleo da banha de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae) na Região do Cariri cearense.

**Pesquisador Responsável:** Waltécio de Oliveira Almeida

**Data de apresentação ao CEUA:** 09/09/11

**Registro no CEUA:** 11-009

**Parecer:** Aprovado na data de 07/10/2011

---

**Prof. Adriana Rolim Campos Barros**  
**Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA**