



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



**IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E
FARMACOLÓGICA DAS GORDURAS CORPORAIS DE
Leptodactylus macrosternum (Miranda- Ribeiro, 1926) e *Leptodactylus
vastus* (Adolf Lutz, 1930) DA REGIÃO DO CARIRI**

MARIO EDUARDO SANTOS CABRAL

CRATO – CE, 2012

MARIO EDUARDO SANTOS CABRAL

**IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E
FARMACOLÓGICA DAS GORDURAS CORPORAIS DE
Leptodactylus macrosternum (Miranda- Ribeiro, 1926) e *Leptodactylus
vastus* (Adolf Lutz, 1930) DA REGIÃO DO CARIRI**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção de produtos Naturais/Microbiologia/Farmacologia.

Orientador:

Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida

Co-Orientador:

Prof. Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves

Cabral, Mario Eduardo Santos.

C117i Identificação química, análise microbiológica e farmacológica das gorduras corporais de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda- Ribeiro, 1926) e *Leptodactylus vastus* (Adolf Lutz, 1930) da Região do Cariri/ Mario Eduardo Santos Cabral. - Crato-CE, 2012.
109p.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA

Orientador: Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida

Co-Orientador: Prof. Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves

1. Anfíbios; 2. Etnozoologia; 3. Leptodactylidae; 4 Atividade Antimicrobiana; 5. Atividade Antiedematogênica. I. Título.

CDD: 591

MARIO EDUARDO SANTOS CABRAL

**IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E
FARMACOLÓGICA DAS GORDURAS CORPORAIS DE
Leptodactylus macrosternum (Miranda- Ribeiro, 1926) e *Leptodactylus
vastus* (Adolf Lutz, 1930) DA REGIÃO DO CARIRI**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais/Microbiologia/Farmacologia. Qualquer citação deste trabalho é permitida, desde que em conformidade com a ética científica.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida (Orientador)

Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves (Avaliador Externo)

Departamento de Biologia, Universidade Estadual da Paraíba – UEPB

Prof (a). Dra. Marta Regina Kerntopf (Avaliador Interno)

Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Avaliador Interno)

Departamento de Química Biológica – URCA

DEDICO a minha esposa Maria Ketully Neyane A. Pinto, e minha filha Sarah Lohanny A. Cabral, por todo carinho que recebi e por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me proporcionou condição física e mental para realização deste trabalho, e por ter iluminado sempre meus caminhos;

Aos meus pais, Mario Alves Cabral Filho e Maria Elzimeire Santos Alves Cabral, por terem me dado à vida, não tão somente ela, mas tudo de bom que aprendi foram por seus ensinamentos, onde através deles pude chegar até onde estou hoje;

A minha querida irmã, Mayara Eleyne Santos Cabral, que nos momentos mais difíceis sempre esteve ao meu lado;

Ao meu orientador Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida, por ter se disponibilizado gentilmente a me orientar neste trabalho, contribuindo sempre com seus valiosos conhecimentos e grande incentivo. Obrigado!

Ao Prof. Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves pela participação como Co-Orientador deste trabalho;

Aos professores Dr. José Galberto Martins da Costa – URCA, Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho – URCA e Prof^a. Msc. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues – URCA pelo apoio, sugestões;

Ao Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila – URCA, pela contribuição na identificação dos espécimes utilizados neste estudo;

Ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes – URCA, e a Prof^a. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça – URCA, pela atenção, cuidado e por participarem nos ensaios farmacológicos;

Aos Coordenadores do PPBM, Dr. Waltécio de Oliveira Almeida e Dr. Allysson Pontes Pinheiro, pela ajuda em condicional;

A todos os professores do programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, por terem transmitido com muita dignidade seus conhecimentos, os quais adquiriram com muito esforço e dedicação;

A meu amigo Diógenes de Queiroz Dias por seu apoio e atenção, sempre disposto a me ajudar independente do dia e hora. Com você aprendi que amigos de verdade ficam pra toda a vida e que somos os principais responsáveis para tornar nossos sonhos realidade;

A Débora Lima Sales e Olga Paiva Oliveira, pela sua amizade, companheirismo e grande ajuda na execução dos ensaios biológicos;

Aos meus companheiros do Laboratório de Zoologia: Felipe Silva Ferreira, Samuel Cardozo Ribeiro (GIOABA), Samuel Vieira Brito, José Guilherme Gonçalves de Sousa (Grande Darwin), e a todos os orientandos dos prof. Robson Waldemar Ávila por terem proporcionado momentos de muita descontração e alegria durante esse período de mestrado. Agradeço em especial aos amigos Diego Alves Teles (Diegão), João Antônio de Araujo Filho, pelo apoio incondicional durante o período de coleta dos anfíbios usados nesse trabalho, Com vocês aprendi o quanto é bom ter amigos de verdade e principalmente conviver com eles;

Aos meus amigos de turma e colegas do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, pela sinceridade, companheirismo, experiências compartilhadas e palavras de conforto nos momentos difíceis que compartilhamos juntos;

Aos Meus amigos Thiago Silva de Almeida (Chefe) e Erlânio Oliveira de Sousa (Joinha) pelo apoio e valiosos conhecimentos compartilhado;

À Universidade Regional do Cariri, pela oportunidade de participar de um curso de pós-graduação bem conceituado pela CAPES;

Ao IBAMA/SISBIO pela licença de coleta concedida, pois sem ela não seria possível à realização desta pesquisa;

À Estação Ecológica de Aiuaba – ESEC e ao seu chefe em exercício Manoel Cipriano de Alencar, pelo apoio logístico durante o período de coleta;

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

As secretárias do curso de pós-graduação, Maria Andecieli Rolim de Brito e Maria Lenira Pereira, por sempre se disporem a ajudar;

Aos funcionários desta IES, que mantiveram o ambiente para o pleno exercício da educação;

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro;

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

“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

(Charles Chaplin)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	16
RESUMO.....	20
INTRODUÇÃO.....	22
OBJETIVOS	24
OBJETIVO GERAL	24
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
REFERENCIAL TEÓRICO	25
ETNOZOOLOGIA E ZOOTERAPIA.....	25
ASPECTOS GERAIS DO BIOMA CAATINGA	30
BIOPROSPECÇÃO E PRODUTOS NATURAIS ORIUNDOS DE ANIMAIS	33
ÓLEOS FIXOS: ESTRUTURA, FUNÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	40
Extração por solvente orgânico.....	42
Interferência de ácidos graxos sobre o processo inflamatório	44
GÊNERO <i>LEPTODACTYLUS</i> : ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO	45
DESCRIÇÃO ZOOLOGICA.....	49
<i>Leptodactylus macrosternum</i> Miranda-Ribeiro, 1926	49
<i>Leptodactylus vastus</i> Adolf Lutz, 1930	50
MATERIAL E MÉTODOS.....	52
COLETA DOS ANFÍBIOS	52
Materiais laboratoriais utilizados.....	52
Material permanente e equipamentos utilizados.....	53
OBTENÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS DE <i>L. MACROSTERNUM</i> (OLM) E <i>L. VASTUS</i> (OLV).....	54
IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	55
ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM).....	55
TESTE MICROBIOLOGICO: PREPARO DAS SOLUÇÕES A PARTIR DOS ÓLEOS.....	56
Preparo da solução inicial e das soluções de teste	56
Microorganismos	56
Meios de cultura.....	57
Preparo e padronização de inóculos bacterianos	57
Drogas	58

Avaliação da Atividade Antimicrobiana: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	58
CIM pelo método de microdiluição em caldo: Execução e Leitura dos Ensaios.....	58
Avaliação da interferência dos óleos sobre a resistência aos antibióticos e antifúngicos: Execução e Leitura do Ensaio	59
ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA ATRAVÉS DE MODELOS DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDOS PELO ÓLEO DE CRÓTON.....	59
Aspectos éticos da pesquisa.....	60
OLM E OLV (Óleo de <i>Leptodactylus macrosternum</i> e Óleo de <i>Leptodactylus vastus</i>)	60
Animais	60
Drogas, reagentes e soluções	60
Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.....	61
Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton	61
Quantificação do edema.....	61
Análise estatística dos dados.....	62
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	63
ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS FIXOS	63
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	64
Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	64
Modulação da Atividade Antibiótica	66
ATIVIDADE DO ÓLEO FIXO DE <i>L. MACROSTERNUM</i> E <i>L. VASTUS</i> NOS MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA	67
Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.....	67
Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton	70
CONCLUSÃO.....	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Exemplos de zooterápicos comercializados na medicina tradicional. Exemplos de zooterápicos comercializados na medicina tradicional. A: endoesqueleto do cavalo marinho (*Hippocampus reidi* [Ginsburg, 1933]), B: cauda do peixe morcego (*Ogcocephalus vespertilio* [Linnaeus, 1758]), C: chocalho da cascavel (*Crotalus durissus* [Linnaeus, 1758]), D: língua do tiú (*Tupinambis* sp.), E: espinhos do coandú (*Coendou prehensilis* [Linnaeus, 1758]) e F: garras da preguiça (*Bradypus* sp.) (modificado de Alves & Rosa, 2006)28

Figura 2 – Exemplos de produtos de origem animal utilizados como remédios e que são vendidos em mercados públicos em Crato e Juazeiro do Norte. A: Pó de fígado de urubu (*Coragyps atratus* [Bechstein, 1793]), B: Casco de veado (*Mazama* sp.), C: Cavalos-marinhos secos (*Hippocampus reidi* [Ginsburg, 1933]), D: Cauda de “tatu peba” (*Euphractus sexcinctus* [Linnaeus, 1758]), E: Chocalho de cascavel (*Crotalus durissus* [Linnaeus, 1758]), F: Óleo da gordura do tiú (*Tupinambis merianae* [Duméril & Bibron, 1839]) (retirado de Ferreira et al., 2009)29

Figura 3 – Modelo estrutural de um triacilglicerol.....40

Figura 4 – A espécie *Leptodactylus macrosternum*, Fonte: Ávila, R.W.50

Figura 5 – A espécie *Leptodactylus vastus*, Fonte: Ávila, R. W.51

Figura 6 – Efeito do OLM ou OLV, administrados por via tópica, no edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton em camundongos. Os animais foram previamente tratados com o controle acetona(C), dexametasona 0,08 mg/orelha (DEX), OLM ou OLV (Puro) e após 15 minutos receberam topicamente óleo de cróton 5% (v/v) em acetona. Os gráficos representam a média do edema de orelha (%) e as barras verticais o E.P.M de 6 animais registrados após 6h da aplicação tópica do óleo de cróton. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e Teste de Student- Newman-Keuls).....68

Figura 7 – Curvas tempo-resposta do efeito do tratamento com OLM (A) ou OLV (B) puros no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss. O experimento foi conduzido em 9 dias. Os animais receberam óleo de cróton em acetona na orelha direita em dias alternados indicado pelos pontos pretos e o veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha (μm) foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação de OC), a orelha dos animais recebeu veículo salina, dexametasona (DEX), OLM ou OLV bruto (20 μL , 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 3 dias posteriores (setas apontam os dias em que houve tratamento). O efeito antiedematogênico dos compostos foi verificado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E.P.M. (* $P < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni)

.....71

Figura 8 – Efeito do OLM ou OLV, administrados por via tópica, no edema de orelha crônico induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos. A aplicação de óleo de cróton foi realizada em dias alternados, durante 9 dias. A partir do 5º dia do experimento, a orelha direita dos animais recebeu acetona (C), dexametasona 0,08 mg/orelha (DEX), OLM ou OLV (Puros) 2 vezes ao dia. Os gráficos representam a média do edema de orelha (%) e as barras verticais o E.P.M de 8 animais registrados após 9 dias da primeira aplicação tópica do óleo de cróton. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e Teste de Student- Newman- Keuls)72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Drogas sintetizadas a partir de toxinas animais	35
Tabela 2 – Características de alguns ácidos graxos comuns	42
Tabela 3 – Peptídeos antimicrobianos obtidos do gênero <i>Leptodactylus</i> descritos na literatura, com suas respectivas atividades	45
Tabela 4 – Estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos isolados da pele de rãs pertencentes ao gênero <i>Leptodactylus</i> . Todos os peptídeos são C-terminal α -amidada..	47
Tabela 5: Espécies depositadas na coleção herpetologica da URCA	52
Tabela 6 – Dados da obtenção dos óleos fixos nas espécies estudadas.....	55
Tabela 7 – Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos	57
Tabela 8 – Drogas e Reagentes e Soluções utilizados durante os procedimentos experimentais farmacológicos	60
Tabela 9 – Ésteres metílicos identificados nos óleos fixos da gordura corporal de <i>Leptodactylus macrosternum</i> (óleo I) e <i>Leptodactylus vastus</i> (óleo II), com as referidas percentagens	63
Tabela 10 – Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos óleos fixos de <i>Leptodactylus macrosternum</i> e <i>Leptodactylus vastus</i> frente a microorganismos padrão e multirresistente	65
Tabela 11 – Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos aminoglicosídeos sozinhos e em associação com os óleos fixos de <i>L. macrosternum</i> e <i>L. vastus</i>	66

Tabela 12 – Efeito do OLM e OLV sobre o edema induzido pela aplicação única de óleo de cróton	68
--	-----------

Tabela 13 – Efeito do OLM e OLV sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.	72
---	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- menos;

% – Por cento; percentual;

< – Menor que;

= – Igual a;

± – Mais ou menos;

® – Marca registrada;

µg- micrograma.

µg/ mL – Micrograma por mililitro;

µg/Kg – Miligrama por kilograma;

µL – Microlitro.

µm – Micrômetro.

µM – Micromol;

13-HOTE – 13-hidroxi-octadecaenóico;

15-LOX – 15- Lipoxigenase;

5HETE – Ácido Hidroxicosatetraenóico;

5-LOX – 5-lipoxigenase;

α – Alfa;

AA – Ácido araquidônico;

AINEs – Antiinflamatórios não- esteroidais;

ANOVA – Análise de Variância;

ATCC – *American Type Culture Collection*;

BHI – *Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração, inglês);

C. albicans – *Candida albicans*;

C. krusei – *Candida Krusei*;

C+ – Controle positivo;

CE – Estado do Ceará (Brasil);

Céls/mL – células por mililitro;

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;

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*;
COX – ciclooxigenase;
COX₂ – Cicloxigenase 2;
DEX – Dexametasona;
DL₅₀ – Dose letal;
DMSO – Dimetilsulfóxido;
E. coli – *Escherichia coli*;
E.I.M – Efeito Inibitório Médio da inflamação;
E.P.M. – Erro Padrão da Média;
et al. – e colaboradores;
eV – Eletrovolt;
g – Gramas;
h –hora(s);
HIA –Heart Infusion Agar;
i.d. – Indicativo de densidade;
I.V. – Intravenosa;
IL-1 – Interleucina 1;
IL-6 – Interleucina 6;
IL-8 – Interleucina 8;
INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde;
iNOS – Óxido nítrico sintetase induzida;
IR – Índice de Retenção;
Kg – Kilograma;
Km² – Kilometro quadrado;
L. macrosternum – *Leptodactylus macrosternum*;
L. vastus – *Leptodactylus vastus*;
LFQM – Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (URCA);
LMBM – Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (URCA);
LOX – lipoxigenase;
LPPN – Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (URCA);
LT – Leucotrienos;
LTB₄ – Leucotrienos B₄;
LZ – Laboratório de Zoologia (URCA);
m/z – Relação massa/carga;

MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
mg/mL – Miligrama por mililitro;
mL – Mililitro;
mm – Milímetro;
 m_{od} – Massa do disco retirado da orelha direita;
 m_{oe} – Massa do disco retirado da orelha esquerda;
 MPE_{cont} – Média do percentual de edema do grupo controle negativo;
 MPE_{trat} – Média do percentual de edema do grupo tratado com OLM, OLV ou fármaco;
n – Número da amostra;
 Na_2SO_4 —Sulfato de Sódio;
NaCl – Cloreto de Sódio;
NCCLS – National Commitee For Clinical Laboratory Standard;
°C – Grau Celsius;
OC – Óleo de cróton;
°C/min – Grau Celsius/min;
OLM – Óleo fixo de *Leptodactylus macrosternum*;
OLV – Óleo fixo de *Leptodactylus vastus*;
OTM – Óleo de *Tupinambis merianae*;
p – Nível de significância;
p. – Pagina;
P. aeruginosa – *Pseudomonas aeruginosa*;
P.A. – Para análise;
p/v – Relação peso/volume;
PAF – Fator ativador de plaquetas;
PAM's – Peptídeos antimicrobianos;
PE – Percentual de edema;
PG – Prostaglandinas;
 PGD_2 – Prostaglandinas D_2 ;
 PGE_2 - Prostaglandinas E_2 ;
 PGF_1 – Prostaglandina 1;
 $PGF_{2\alpha}$ - Prostaglandinas F_2 alfa;
 PGI_2 – Prostaglandinas I_2 ;
pH – Potencial Hidrogeniônico;
PKC – Proteina cinases C;

PLA₂ – Fosfolipase A₂;

S. aureus –*Staphylococcus aureus*;

TNF α – Fator de Necrose Tumoral;

TPA – 13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol;

TR – Tratamento;

TX – Tromboxanos;

UFC/mL –Unidade Formadora de Colônia por mililitro;

URCA – Universidade Regional do Cariri;

USA – Estados Unidos da América;

v/v – Volume/volume;

Ø – diâmetro.

RESUMO

IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA, ANÁLISE MICROBIOLÓGICA E FARMACOLÓGICA DAS GORDURAS CORPORAIS DE *Leptodactylus macrosternum* (Miranda- Ribeiro, 1926) e *Leptodactylus vastus* (Adolf Lutz, 1930) DA REGIÃO DO CARIRI

Os anfíbios são um grupo de animais que apresentam baixo número de citações de uso medicinal no Nordeste brasileiro. O gênero *Leptodactylus* abriga a maior parte dos relatos de uso de produtos naturais obtidos de anfíbios para fins medicinais. As espécies *L. macrosternum* e *L. vastus* (Família: Leptodactylidae), são amplamente encontradas no bioma caatinga. No Nordeste brasileiro a gordura corporal de *L. vastus* é utilizada como zoterápico no tratamento de diversas enfermidades como inflamação de garganta, tosse, asma, artrite e dor nas costas. Até a presente data não existem relatos do uso de produtos naturais obtidos de *L. macrosternum*, sendo sua caracterização neste estudo justificada devido à proximidade filogenética com *L. vastus*. Este trabalho teve por objetivo apresentar a composição química da gordura corporal de *L. macrosternum* e *L. vastus*, avaliar sua atividade antimicrobiana e antiedematogênica, além de mostrar as implicações ecológicas de seu uso na medicina tradicional. Os animais foram coletados na Estação Ecológica de Aiuaba – CE, em seguida foram anestesiados com associação de quetamina e xilazina e sacrificados para a remoção de sua gordura corporal. Os óleos de *L. macrosternum* (OLM) e *L. vastus* (OLV) foram extraídos da gordura corporal localizada na região ventral desses anfíbios usando hexano como solvente. O rendimento observado na extração do OLM (36,55%) foi superior ao obtido pelo OLV (18,24%). Os ácidos graxos foram determinados indiretamente usando seus correspondentes ésteres metílicos. A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas. A atividade antimicrobiana de ambos os óleos foi demonstrada através do método de microdiluição em caldo frente a linhagens de microorganismos padrão e multiresistentes. Foram utilizadas linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida krusei*, quando sozinha ou em combinação com antibióticos e antifúngicos. Na determinação da CIM, os óleos apresentaram inibição do crescimento microbiano significativo. Para o OLM evidenciou-se CIM 256 µg/mL frente a *P. aeruginosa* ATCC 15442, e o mesmo resultado foi observado para o OLV frente a *C. krusei* ATCC 6258. No entanto na associação dos óleos com os antibióticos e antifúngicos não foram observados efeito sinérgico. A interação entre OLV e o antibiótico neomicina gerou um efeito antagônico frente a *S. aureus* 358 e *P. aeruginosa* 22. Para a avaliação da atividade antiedematogênica foi utilizado o modelo de edema de orelha em camundongos induzido por óleo de cróton (agudo e crônico). No edema induzido pela aplicação única de óleo de cróton ambos os óleos não demonstram efeito antiedematogênico. Na aplicação múltipla de óleo de cróton a partir de 120 h tanto o OLM como o OLV demonstraram redução significativa do edema. O efeito inibitório médio foi de 58% para OLM e de 66% para OLV.

Palavras Chaves: Anfíbios, Etnozoologia, Leptodactylidae, Atividade Antimicrobiana, Atividade Antiedematogênica.

ABSTRACT

CHEMICAL IDENTIFICATION, MICROBIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF BODY FAT OF *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) and *Leptodactylus vastus* (Adolf Lutz, 1930) IN THE REGION OF CARIRI

Amphibians are a group of animals that have a low number of citations of medicinal use in the Brazilian Northeast. The genus *Leptodactylus* houses most of the reported use of natural products obtained from amphibians for medicinal purposes. The species *L. macrosternum* and *L. vastus* (Family: Leptodactylidae), are widely found in the caatinga biome. In the Brazilian Northeast body fat *L. vastus* is used as the treatment of various illnesses such as sore throat, cough, asthma, arthritis and back pain. To date there are no reports of the use of natural products obtained from *L. macrosternum*, its characterization in this study is justified because of the close phylogenetic relationship with *L. vastus*. This study aimed to present the chemical composition of body fat *L. macrosternum* and *L. vastus*, evaluate its antimicrobial and antiedematogenic activity, besides showing the ecological implications of its use in traditional medicine. The animals were collected in the Ecological Station of Aiuaba – CE, then were anesthetized with ketamine and xylazine association and sacrificed to remove your body fat. Oils *L. macrosternum* (OLM) and *L. vastus* (OLV) were extracted from the fat body located in the abdominal region of amphibian using hexane as a solvent. The extraction yield observed in the OLM (36.55%) was higher than that obtained by OLV (18.24%). Fatty acids were determined indirectly by using their corresponding methyl esters. The identification of methyl esters of fatty acids was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The antimicrobial activity of both oils was demonstrated by the broth microdilution method against standard strains and multiresistant microorganisms. Strains used were *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* and *Candida krusei*, when alone or in combination with antibiotics and antifungals. MIC determination in oils showed significant inhibition of microbial growth. For OLM revealed a CIM 256 mg / mL against *P. aeruginosa* ATCC 15442, and the same result was observed for OLV against *C. krusei* ATCC 6258. However the association of oils with antibiotics and antifungals were not observed synergistic effects. The interaction between OLV and the antibiotic neomycin generated an antagonistic effect against *S. aureus* 358 and *P. aeruginosa* 22. To evaluate the activity antiedematogenic model was used ear edema in mice induced by croton oil (acute and chronic). Edema induced by single application of croton oil both oils show no effect antiedematogenic. When applying multiple croton oil from 120 h as both OLM and OLV were also significantly reduced the edema. The mean inhibitory effect was 58% for OLM, and from 66% to OLV.

Keywords: amphibians, ethnozoology, Leptodactylidae, Antimicrobial Activity, Antiedematogenic Activity.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma ampla diversidade de espécies animais, que junto com sua extensa diversidade cultural, é refletida em um conhecimento complexo do uso dos recursos faunísticos (ALVES & ROSA, 2005; RODRIGUES, 2006, ALVES et al., 2010). Substâncias naturais de origem animal, vegetal e mineral vêm sendo utilizadas como fonte de medicamentos desde tempos remotos (LEV, 2003). Comunidades humanas desenvolveram um acurado saber acerca das propriedades terapêuticas e medicinais dos animais, e o uso desses recursos naturais como remédio pode representar uma opção na substituição de medicamentos que a indústria farmacêutica coloca à disposição da população, a preços que não condizem com a sua realidade sócio-econômica ou cultural (ALVES & ROSA, 2005).

Segundo Coutinho (2010) embora a zooterapia seja, muitas vezes, considerada como uma crença ou superstição, sua importância não pode ser negada, pois diferentes espécies têm sido sistematicamente testadas para validação e avaliação de suas atividades biológicas e farmacológicas por companhias farmacêuticas em busca de novos fármacos. Stankevics et al. (2008) avaliaram a atividade anti-mutagênica, de extratos da esponja *Arenosclera brasiliensis*. Barros et al. (2007) isolou do plasma da *Ascidia Styela plicata* o polissacarídeo galactoglucano sulfatado, o qual demonstrou alto poder anestésico.

O uso dos recursos biológicos torna-se ainda mais importante em áreas como o semi-árido nordestino, onde predomina o bioma Caatinga, no qual vivem cerca de 15% da população brasileira, mais de 25 milhões de pessoas (MITTERMEIER et al, 2002). A caatinga é o único bioma exclusivamente brasileiro e abrange a maior parte geográfica do Nordeste do Brasil, sendo composta por paisagens únicas e vasta diversidade ecológica (SILVA et al, 2003).

A bioprospecção é definida como uma pesquisa de material biológico que objetiva a exploração dos seus recursos genéticos, garantindo o uso sustentável, a utilização de estratégias de conservação, a garantia de distribuição justa e igualitária dos benefícios advindos de sua utilização, como também a promoção e regulamentação de novas tecnologias (AZEVEDO, 2003).

Dentro de uma perspectiva médica, o conhecimento tradicional tem sido um forte aliado da bioprospecção (RASKIN et al., 2002; RAGAVAN, 2008), uma vez que

diversos organismos usualmente utilizados na medicina tradicional vêm sendo testados para a produção de medicamentos (RASKIN et al., 2002).

Em estudos realizados por ALVES, (2009) FERREIRA et al (2012) os autores mostraram que a categoria taxonômica dos anfíbios apresentou apenas 3 espécies sendo utilizadas como zoterápicos no Nordeste do Brasil, e dentre os anfíbios citados está presente a espécie *L. vastus*. A gordura dessa espécie é indicada para o tratamento de inflamações de garganta, tosse, asma, artrite e dor nas costas. A investigação do potencial biológico das espécies *L. macrosternum* neste trabalho é ratificado pela sua relação de parentesco com *L. vastus*, usando como justificativa o método quimiotaxonômico, que leva em consideração as relações filogenéticas entre os organismos e, a partir dessas informações realiza a investigação das propriedades farmacológicas (SMELCEROVIC et al., 2006).

Portanto o objetivo deste trabalho foi identificar os constituintes químicos presentes nos óleos fixos de *L. macrosternum* e *L. vastus*, bem como avaliar suas atividades antimicrobianas *in vitro* e atividade antiedematogênica usando modelos de edema de orelha *in vivo*. Este é o primeiro relato sobre a investigação das atividades biológicas citadas anteriormente para produtos naturais obtidos das espécies em questão.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar a composição química e as atividades microbiológica e farmacológica das gorduras de *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro, 1926 e *Leptodactylus vastus* Adolf Lutz, 1930.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Obter os óleos provenientes das gorduras das espécies em estudo e caracterizá-los quimicamente;
2. Avaliar o espectro de ação e o grau de inibição dos óleos obtidos a partir da gordura de *L. macrosternum* e *L. vastus*, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos mais efetivos sobre as linhagens de microorganismos patogênicas;
3. Verificar a eficácia dos óleos na modulação da resistência bacteriana e fúngica à aminoglicosídeos e antifúngicos comumente utilizados;
4. Avaliar a atividade antiedematogênica dos óleos de *L. macrosternum* e *L. vastus* por via tópica através do modelo de edema de orelha induzidos pelo óleo de cróton (modelo agudo e crônico).

REFERENCIAL TEÓRICO

ETNOZOOLOGIA E ZOOTERAPIA

A manifestação do conhecimento zoológico tradicional remonta ao tempo em que os primeiros hominídeos tomaram interesse pelas espécies animais com as quais conviviam e das quais dependiam para sua sobrevivência simbólica e material (SANTOS-FITA & COSTA-NETO, 2007). Pinturas rupestres, que normalmente representam figuras de animais selvagens e a caça são evidências da antiga relação entre humanos e animais (ALVES & SOUTO, 2010). Produtos derivados da fauna são utilizados de diferentes formas, sobretudo para fins alimentares, mas também como vestuário, ferramentas, e uso medicinal e mágico-religioso (ALVARD et al, 1997; ALVES et al, 2009; INSKIP & ZIMMERMANN, 2009). Animais totêmicos ou ancestrais, mitológicos (imaginários) ou deuses-animais estão presentes em toda a história humana (ALLABY, 2010).

A variedade de interações (do passado e presente) que as culturas humanas mantêm com animais é objeto de estudo da etnozootologia, uma ciência que tem raízes profundas com as primeiras relações entre humanos e outros animais (ALVES & SOUTO, 2011). O primeiro estudo publicado com abordagem etnozoológica foi o de Stearns (1889), sobre “ethno-conchology”, o estudo do uso primitivo de conchas como moeda (ALVES & SOUTO, 2010), entretanto o termo etnozootologia foi cunhado por Manson, em 1899, através do seu artigo *Aboriginal American Zootechy* como um sinônimo de Zoologia dos índios americanos, incluindo-a como ramo da zootecnia (MASON, 1899). Por este motivo, acredita-se que, o termo etnozootologia tenha ficado em esquecimento até meados da segunda década do século XX (SANTOS-FITA & COSTA-NETO, 2007). Em 1914 Handerson e Harrington começam a considerar a Etnozootologia como uma disciplina, referindo-se a ela como o estudo das culturas existentes e suas relações com os animais no ambiente deles (HANDERSON & HARRINGTON, 1914).

Ao longo dos anos outras definições foram sendo gradativamente concebidas para se referir ao termo etnozootologia. Para Overall (1990), a etnozootologia diz respeito ao estudo dos conhecimentos, significados e usos dos animais nas sociedades humanas. Marques (2002) a considera como o estudo transdisciplinar dos pensamentos e

percepções (conhecimentos e crenças), dos sentimentos (representações afetivas) e dos comportamentos (atitudes) que intermedia as relações entre populações humanas que os possuem com as espécies de animais dos ecossistemas que as incluem. Parafraseando Campos (1994), traduz-se como o estudo da ciência zoológica do “outro”, construída a partir do referencial de saberes da academia. Ou, ainda, o estudo do que indivíduos sabem sobre os animais que não é ensinado pela ciência (ELLEN, 1997). A visão exposta por Willians & Ortiz-Solorio (1981) dá ao prefixo “etno” uma abordagem mais integradora e mais abrangente (portanto, mais adequada). Todas essas definições são válidas e a essência das mesmas as torna sinônimas (ALVES & SOUTO, 2010).

Considerando que a etnozootologia faz parte de uma ciência maior, a etnobiologia, o histórico de desenvolvimento se sobrepõem (ALVES & SOUTO, 2010). O processo de formação do campo da etnobiologia e, por conseguinte, da etnozootologia, foi estudado por Clément (1998), onde para este autor, três fases, denominadas pré-clássica, clássica e pós-clássica, testemunharam tanto as mudanças de atitude quanto o enfoque teórico metodológico dos pesquisadores ao longo do tempo (SANTOS-FITA & COSTA-NETO, 2007).

Nos primeiros séculos após o descobrimento, naturalistas e exploradores que chegarem nesse país encontraram uma abundante e diversificada fauna, que foi documentada (ALVES & SOUTO, 2011). O primeiro artigo publicado no Brasil com enfoque etnozootológico apareceu em 1939, tratando de descrever um ensaio sobre o vocabulário zoológico popular usado por nativos brasileiros (VON IHERING, 1939). Estes documentos representaram o marco inicial da etnozootologia no Brasil, mas somente a partir do século XX foi que as publicações etnozootológicas alcançaram números expressivos de publicações e grande diversidade de temas analisados (ALVES & SOUTO, 2011).

Estudos etnobiológicos têm demonstrado que as populações nativas ou locais possuem um profundo conhecimento sobre a natureza e sobre a importância de vários recursos biológicos para os mais variados povos (BEGOSSO et al, 1999; MOURÃO et al, 2006, MOURÃO & NORDI, 2002; NISHIDA et al, 2006a).

A zooterapia pode ser definida como o tratamento de doenças humanas a partir da utilização de produtos considerados potencialmente medicamentosos, elaborados de partes do corpo animal, de produtos do seu metabolismo, como secreções corporais e excrementos, ou de materiais construídos por eles, como ninhos e casulos (ANDRADE & COSTA-NETO, 2006). Desde os tempos antigos animais e produtos derivados de

diferentes órgãos têm constituído parte dos inventários de substâncias medicinais usadas em várias culturas (LEV, 2003). De acordo com Marques (1994) toda comunidade que possui um sistema de saúde desenvolvido utiliza ou já utilizou animais como fonte de medicamentos onde isso é definido como a “Hipótese da Universalidade Zooterápica”. Papiros, arquivos e escrituras antigas atestam o uso de recursos animais para fins medicinais, provavelmente, desde a pré-história (LEV, 2003). O tratamento de algumas doenças humanas tem sido usado em comunidades tradicionais por remédios a base de animais conhecidos como zoterápicos ou zoterapêuticos (ALVES & ROSA, 2005). Animais inteiros ou em partes são amplamente utilizados para o tratamento de várias doenças em muitos países do mundo (ALVES, 2009).

A zooterapia popular, baseada nas práticas e saberes populares, integram um sistema médico bastante complexo no qual estão incluídas entre outras práticas populares de saúde, as simpatias e as profilaxias mágicas, tais como patuás, bentinhos, amuletos, talismãs, gestos e transferências (ARAÚJO, 1977). As práticas zoterápicas geralmente são transmitidas de geração a geração, especialmente por meio oral, e estão associadas com outros aspectos da cultura da qual fazem parte (FLEMING-MORAN, 1992). Assim, o uso de substâncias animais deve ser compreendido segundo uma perspectiva cultural, uma vez que sistemas médicos são organizados enquanto sistemas culturais (COSTA-NETO & ALVES, 2010).

Documentos históricos indicam que o uso de animais medicinais no Brasil vem desde a colonização (ALMEIDA, 2005). Entretanto, somente a partir dos anos 80, estudos vêm demonstrando a importância da zooterapia para comunidades tradicionais em diferentes regiões do Brasil (ALVES, 2006). A título de comparação, enquanto 3722 trabalhos foram publicados acerca de plantas medicinais no Brasil, apenas 28 trabalhos que tratam especificamente sobre o uso de animais para fins medicinais foram até o momento (CALIXTO, 2005). A escassez de trabalhos sobre zooterapia no Brasil, assim como ocorre em todo o mundo, tem contribuído para que a importância dos recursos zoterápicos venha sendo subestimada no país.

O uso de animais medicinais ocorre tanto em áreas rurais quanto em áreas urbanas. Nas cidades, os animais medicinais são comercializados por erveiros em mercados e feiras livres espalhados por todo o país (COSTA-NETO, 1999; ALMEIDA & ALBUQUERQUE, 2002; SILVA et al., 2003). No trabalho de Alves & Rosa (2006), no município de raposa e APA Barra do rio Mamanguape, os autores registraram o uso de 100 espécies de animais (72 vertebrados e 28 invertebrados) para fins medicinais,

dos quais 31 eram comuns a ambas as comunidades estudadas (Figura 1, p. 28). Em Teresina, Alves & Rosa (2007a) relataram 25 espécies de animais utilizados como zoterápicos, onde 19 dessas espécies são utilizadas para o tratamento de doenças do sistema respiratório. No Maranhão, Alves & Rosa (2007b) listaram o uso e a comercialização de animais no município de Raposa. Em Remanso, Moura & Marques (2008) identificaram 52 espécies de animais usadas no tratamento de 39 doenças e para rituais mágico/religioso. Nas cidades do Crato e Juazeiro do Norte Ferreira et al (2009) relataram o uso e a comercialização de zoterápicos oriundos de 31 espécies de animais (Figura 2, p. 29).



Figura 1 – Exemplos de produtos animais usados como remédios nas áreas de estudo Raposa e Mamanguape. A: endoesqueleto do cavalo marinho (*Hippocampus reidi* [Ginsburg, 1933]), B: cauda do peixe morcego (*Ogcocephalus vespertilio* [Linnaeus, 1758]), C: chocalho da cascavel (*Crotalus durissus* [Linnaeus, 1758]), D: língua do tiú (*Tupinambis* sp.), E: espinhos do coandú (*Coendou prehensilis* [Linnaeus, 1758]) e F: garras da preguiça (*Bradypus* sp.) (modificado de Alves & Rosa, 2006).



Figura 2 – Exemplos de produtos de origem animal utilizados como remédios e que são vendidos em mercados públicos em Crato e Juazeiro do Norte. A: Pó de fígado de urubu (*Coragyps atratus* [Bechstein, 1793]), B: Casco de veado (*Mazama* sp.), C: Cavalos-marinhos secos (*Hippocampus reidí* [Ginsburg, 1933]), D: Cauda de “tatu peba” (*Euphractus sexcinctus* [Linnaeus, 1758]), E: Chocalho de cascavel (*Crotalus durissus* [Linnaeus, 1758]), F: Óleo da gordura do tiú (*Tupinambis merianae* [Duméril & Bibron, 1839]) (retirado de Ferreira et al., 2009).

Algumas espécies de animais comercializadas para uso medicinal estão registradas em livros e listas de espécies raras ou ameaçadas, e uma das causas se atribui à pressão exercida pelo excessivo extrativismo (ALVES & ROSA, 2007). Por outro lado, é importante salientar que o uso de animais devido ao seu valor medicinal é uma das formas de utilização da diversidade biológica (CELSONO, 1992). Por séculos, povos indígenas vêm coletando plantas e animais sem ameaçar a dinâmica populacional das espécies devido ao baixo nível de exploração (ANYINAM, 1995). Nesse sentido, estudos adicionais são necessários, sobretudo considerando a importância da modalidade de terapia, que embora seja amplamente disseminada em todo o mundo, ainda é pouco pesquisada (COSTA-NETO & ALVES, 2010).

ASPECTOS GERAIS DO BIOMA CAATINGA

A Caatinga, termo de origem Tupi que significa “mata branca”, referindo-se ao aspecto da vegetação durante a estação seca, quando a maioria das árvores perde as folhas e os troncos esbranquiçados e brilhantes dominam a paisagem (LEAL et al, 2005). É hoje considerado um Bioma de especificidade brasileira, isso significa que grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em nenhum outro lugar do mundo. Porém, é pouca a atenção à conservação de sua variada e marcante paisagem (BRASIL, 2003a; LEAL et al, 2005).

Segundo Angelotti *et al.* (2009), o bioma caatinga, dentre os biomas brasileiros, é o menos conhecido cientificamente e sempre foi visto como um espaço pouco importante, sem prioridade e sem necessidade de conservação, não obstante ser um dos mais ameaçados, devido ao uso inadequado e insustentável dos seus solos e dos recursos naturais, e por ter apenas 1% de remanescentes protegidos por unidades de conservação.

A região semi-árida, ou do Bioma Caatinga, compreende 925.043 Km², ou seja 55,6% do Nordeste brasileiro, representando o principal ecossistema dessa região (SILVA et al, 2003), e abriga uma população de 20 milhões de habitantes, equivalendo a 18% da população brasileira (IBGE, 2004).

Este Bioma se estende pela totalidade do estado do Ceará (100%) e mais de metade da Bahia (54%), da Paraíba (92%), de Pernambuco (83%), do Piauí (63%) e do Rio Grande do Norte (95%), quase metade de Alagoas (48%) e Sergipe (49%), além de

pequenas porções de Minas Gerais (2%) e do Maranhão (1%), correspondendo a cerca de 10% do território nacional (BRASIL, 2004), e segundo delimitação do IBGE (2004), situa-se entre os paralelos 3° e 17° S e meridianos 35° e 45° W, sua área equivale a 9,92% do território nacional, área maior que a da Espanha e a de Portugal juntas.

As ecorregiões do bioma Caatinga ou as Grandes Unidades de Paisagem, conforme estabelece o ZANE – Zoneamento Agroecológico do Nordeste (SILVA et al, 1994), são as seguintes: Chapadas Altas; Chapada Diamantina; Planalto da Borborema; Superfícies Retrabalhadas; Depressão Sertaneja; Superfícies Dissecadas dos Vales do Gurguéia, Parnaíba, Itapecuru e Tocantins; Bacias Sedimentares; Superfícies Cársticas; Áreas de Dunas Continentais; e Maciços e Serras Baixas.

O clima semi-árido dominante nesse bioma caracteriza-se por apresentar baixa umidade relativa do ar e pelo regime pluvial irregular, com 400 a 800 mm anuais. Nas áreas de clima semi-árido os solos são rasos, com ocorrência de vegetação do tipo xerófila, resistente a longos períodos de estiagem (BRASIL, 2007).

Levantamentos sobre a apifauna do domínio Caatinga revelam a presença de cerca de 190 espécies de insetos, abelhas, formigas e cupins. Sobre a biota aquática os conhecimentos são ainda incipientes, sendo os peixes os mais estudados: 240 espécies de peixes das quais, aproximadamente, 57 são endêmicas deste bioma. A herpetofauna da Caatinga também é pouco conhecida, sendo esta representada por 47 espécies de lagartos, dez anfíbenídeos, 52 espécies de serpentes, quatro de quelônios, três crocodilos e 48 anfíbios, dos quais existe um endemismo de 15%. Sobre a avifauna foram registradas até o momento cerca de 510 espécies, das quais aproximadamente 92% se reproduzem na região, estimando-se que cerca de 15 espécies e 45 subespécies sejam endêmicas desse bioma. O grupo dos mamíferos, em geral, é de pequeno porte, sendo os roedores os mais abundantes, representando um total de 148 espécies (DRUMOND; SCHISTEK; SEIFFARTH, 2012).

Em relação à flora, a paisagem é dominada por uma vegetação arbustiva, ramificada e espinhosa, com predominância de representantes das famílias Caesalpinaceae, Mimosaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae e Cactáceas (DRUMOND et al., 2000). Existem muitos gêneros endêmicos de cactáceas, como *Leocereus*, *Tacinga* e *Zehntnerella* (PRANCE, 1987). Outros gêneros comuns da caatinga atual são *Bromelia* (Bromeliaceae), *Pilosocereus* (Cactaceae), *Caesalpinia* (Caesalpinaceae, Leguminosae), *Aspidosperma* (Apocynaceae), *Mimosa* (Mimosaceae, Leguminosae) e *Caliandra* (Fabaceae, Leguminosae) (LEAL et al, 2005).

Estudos revelam uma ampla lista de espécies vegetais endêmicas da Caatinga, com cerca de 7 a 18 gêneros e até 318 espécies na região, pertencentes a 42 famílias (BRASIL, 2003a). O mito de que a Caatinga é um ecossistema pobre é uma informação errônea e tem origem ao seu aspecto seco presente na maior parte do ano. Esse mito vem sendo enfraquecido à medida que, cada vez mais estão sendo descobertas novas espécies endêmicas de plantas e animais (LEAL *et al.* 2003)

A caatinga arbórea é rara, esparsa e fragmentada, pois cerca de 30,4 a 51,7%, ou mais, da sua área foi alterada por atividades antrópicas (LEAL *et al.* 2005). Diante das diversas utilidades (madeireira, energética, medicinal, frutífera e artesanal) e do extrativismo que espécies vegetais vêm sendo submetidas, sem reposição, a existência natural das mesmas e da fauna a elas associada vêm sendo comprometida. A forma de obtenção dos recursos medicinais e madeireiros da caatinga tem levado à preocupação para proteger áreas remanescentes (ALBUQUERQUE; ANDRADE, 2002) uma vez que a crescente demanda favorece o aumento de degradação.

De acordo com Kiill (2002) esse ecossistema encontra-se ameaçado; e a exploração extrativista pela população local, tem levado a uma rápida degradação ambiental. Tabarelli & Vicente (2002) ressaltam a importância da ampliação urgente do conhecimento sobre os organismos e as comunidades, além de sua distribuição nos ambientes de Caatinga, já que este é o terceiro bioma brasileiro mais alterado pelo homem e o menos conhecido da América do Sul. Andrade *et al.* (2005) enfatizam que há uma necessidade urgente do manejo da caatinga, como forma de compatibilizar a exploração e a diversidade biológica em um dos biomas mais frágeis do País.

O ritmo acelerado de utilização dos recursos naturais da Caatinga (incluindo o uso medicinal de animais e plantas) torna estratégico e imprescindível o desenvolvimento de estudos que visem avaliar os efeitos dos vários distúrbios causados pelas atividades humanas sobre a biodiversidade, em busca de mecanismos alternativos que, se por um lado, promova o desenvolvimento sócio-econômico regional, por outro esteja também ligado ao nosso compromisso ético de manter a “saúde” dos ecossistemas para as próximas gerações (ALVES *et al.* 2009).

BIOPROSPECÇÃO E PRODUTOS NATURAIS ORIUNDOS DE ANIMAIS

Uma forma de conhecer e investigar os elementos potenciais da biodiversidade é através da bioprospecção (MATIAS, 2010). A bioprospecção consiste numa antiga pratica de identificação e avaliação de material biológico encontrado na natureza, para o desenvolvimento de novos produtos ou processos (LAIRD, 2007; ARTUSO, 2002; SCOTT, 2001), ou ainda pode ser definida como a exploração da biodiversidade a fim de se extraírem recursos genéticos e bioquímicos de valor econômico e social (BEATTIE, 2005), que pode fazer uso do conhecimento de indígenas e/ou tradicionais (SANT'ANA, 2002), aplicando tecnologias avançadas para desenvolver novos produtos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos, fragrâncias, enzimas industriais, entre outros. (ARTUSO, 2002).

Segundo Ragavan (2008) este processo é dividido em três passos: o primeiro seria a exploração, extração e *screening* dos recursos biológicos; o segundo passo compreende a etapa de experimentação do recurso; e a terceira etapa a fase de comercialização e validação do recurso analisado. A partir deste conceito, a bioprospecção molecular, de forma multidisciplinar (envolvendo as ciências biológicas e da saúde), objetiva levantar informações importantes quanto à aplicabilidade de moléculas e substâncias químicas provenientes de material biológico para fins diversos, ao mesmo tempo salientando a importância do seu uso sustentável e de sua conservação para as futuras gerações (MATIAS, 2010).

O Brasil é considerado o país da “megadiversidade”: por abrigar 20% das espécies conhecidas do mundo (GORENSTEIN, 2009). Diante deste fato, nosso país encontra-se numa posição importante e extremamente privilegiada, pois detém elevada quantidade de matéria-prima essencial para o fornecimento de produtos naturais na produção de medicamentos. O termo produto natural é atribuído ao material biológico que fornece substâncias com moléculas bioativas, que podem ser únicas a um organismo ou comuns a um grupo de organismos filogeneticamente relacionados (MANN, 1987).

Hunt & Vicent (2006) e Mayer & Gustafson (2008) afirmam que os recursos faunísticos vêm sendo testados para a produção e/ou isolamento de compostos bioativos. Bosch et al. (2009) identificaram e isolaram um peptídeo denominado hidramacina-1 (MRTVVFFILVSIFLVALKPTGTQA) da *Hydra* com atividade contra

bactérias. Wang et al. (2009) isolou uma proteína (hepcidina) do sistema imune do peixe *Pseudosciaena crocea* demonstrando uma atividade antibactericida e antifúngica.

Opoterápicos são medicamentos específicos obtidos a partir de órgãos, glândulas, tecidos e secreções de animais (BRASIL, 2007). Moléculas isoladas de produtos naturais oriundos de animais são cada vez mais utilizados como princípio ativo de fármacos (Tabela 1, p. 35), por exemplo, a substância química Captopril® isolada da peçonha da serpente *Bothrops jararaca* age no controle da pressão arterial.

Nesse contexto, conclui-se que a utilização da prática bioprospectiva para avaliar produtos naturais oriundos de animais pode ser uma importante ferramenta na descoberta de novas moléculas utilizadas para a produção de fármacos.

Tabela 1: Drogas sintetizadas a partir de toxinas animas.

Espécie	Medicamento	Princípio Ativo	Empresa	Ação	Estágio	Fonte
<i>Bothrops jararaca</i> (serpente)	Capoten	Captopril	Par Pharm	Inibidor de ACE (anti-hipertensivo)	Aprovado em 1981	Food and drug Administration
<i>Sistrurus m. barbouri</i> (serpente)	Integrilin	Eptifibatide (barbourina)	Schering	Inibidor de integrina (anti-trombose)	Aprovado em 1998	Food and drug Administration
<i>Agkistrodon rhodostom</i> (serpente)	Viprinex TM	Ancrod	RxMed	Cliva fibrinogênio (usado no tratamento de derrames)	Fase III	ClinicalTrials.gov
<i>Pseudonaja textilis</i> (serpente)	–	Textilinina-1	QRxPharma	Inibidor de plasmina - Antifibrinolítico (anti-hemorrágico)	Aguarda testes clínicos	QRxPharma
<i>Bothrops atrox</i> (serpente)	Baquting	Batroxobina	Nuokang	Hemocoagulase (anti-hemorrágico)	Aguarda aprovação do FDA	QRxPharma
<i>Conus marmoreus</i> (gastrópode)	XEN2174	χ-MrlA	Xenome Ltd.	Inibidor de transportador de noradrenalina (tratamento da dor neuropática – mais eficiente que morfina)	Fase II	Martin et al., 2009; Brust et al., 2009
<i>Conus magus</i> (gastrópode)	Prialt	ω-conotoxina MVIIA	Elan Pharms	Inibidora de canal de cálcio Ca _v 2.2 (tratamento da dor crônica severa inflamatória e neuropática de câncer e AIDS)	Aprovado em 2004	Food and drug Administration
<i>Heloderma suspectum</i> (lagarto)	Byetta	Exenatide	Amylin Pharms Inc.	Peptídeo glucagon-símile-1 (tratamento de diabetes tipo 2)	Aprovado em 2005	Food and drug Administration
<i>Grammostola spatulata</i> (aranha)	–	GsMTx-4	–	Inibidor de canais mecano-sensitivos (tratamento da dor, arritmia cardíaca, distrofia muscular, atividade antimicrobiana, etc)	–	Bowman et al., 2007; Park et al., 2008
<i>Epipedobetes tricolor</i> (anfíbio)	–	ABT894	Abbott	Atua na sinapse ganglionar inibindo a ação da acetilcolina (analgésico)	Fase I	Falkenberg & Pereira, 2007

O PROCESSO INFLAMATÓRIO E A ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DE PRODUTOS NATURAIS

O sistema imune, entre várias outras funções, desempenha um papel fundamental no reconhecimento rápido e eliminação de microorganismos patogênicos, através de diferentes processos, tais como fagocitose e indução de inflamação (SKELDON; SALEH, 2011). A inflamação é classicamente definida como uma resposta fisiológica que pode ser desencadeada, dentre outros estímulos, pela invasão microbiana e/ou agressão tecidual, fundamental para o retorno à homeostase (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; MEDZHITOV, 2008).

A palavra inflamação pode ser apropriadamente referida como uma cascata inflamatória, e que consiste de uma longa cadeia de reações e atividades celulares com o intuito de reparar o tecido, em que ocorre uma lesão ou destruição celular, ocorrendo atividades celulares, aumento dos de arteríolas e vênulas, assim como aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo, como consequência, o acúmulo de líquidos (CARVALHO, 2004). Esta inflamação, geralmente aguda, é a resposta inicial ao agressor e pode tornar-se desconfortável para o paciente devido ao edema formado e a dor.

Além do combate ao agente agressor, de forma a evitar a sua disseminação a outras regiões do corpo, a resposta inflamatória tem a finalidade de eliminar produtos resultantes da destruição celular, assim, promovendo condições ideais para a reparação do tecido lesado. Todo esse processo de restituição da normalidade tecidual é concluído pela reparação, fenômeno inseparável da inflamação (TEDGUI e MALLAT, 2001).

Supondo que não existisse o processo inflamatório, teríamos consequências graves: haveria um descontrole das infecções, não haveria cicatrização das feridas além de o processo destrutivo nos órgãos atacados seria permanente. As reações inflamatórias, por exemplo, são o pilar de doenças crônicas, tais como a artrite reumatóide, a aterosclerose e a fibrose pulmonar, assim como de reações de hipersensibilidade potencialmente fatais a picadas de insetos, drogas e toxinas.

Existe uma série de fenômenos biológicos envolvidos no processo inflamatório, que se associam e se complementam, com isso, formam reações em cascata, envolvem a interação complexa entre as células inflamatórias, tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos (TEDGUI e MALLAT, 2001). Esses fenômenos podem ser desencadeados por vários fatores, chamados agentes flogogênicos. Dentre os tipos flogogênicos,

destacam-se: a) agentes físicos, em que os fatores físicos, como o calor excessivo (queimaduras), o frio exagerado (congelamento), traumatismos, fraturas, incisões, raios ultravioleta e radiações ionizantes são as causas importantes da inflamação; b) agentes químicos, neste caso, a inflamação é determinada pela ação de substâncias químicas de natureza muito variadas, como substâncias cáusticas, ácidos, álcalis, óleo de cróton, terebentina, formaldeído, carragenina; c) agentes infecciosos, em que o fator desencadeante da inflamação é de origem biológica, como bactérias, fungos, vírus, protozoários, etc.. (CARVALHO, 2004).

A palavra inflamação, do grego *phlogosis* e do latim *flamma*, significa fogo, área em chamas, foi descrita pela primeira vez por Celsus, um escritor romano que viveu entre os anos 30 aC e 38 dC, onde observou os quatro sinais cardinais da inflamação: calor (aumento da temperatura local), rubor (hiperemia), tumor (edema) e dor, as quais Virchow acrescentou o quinto sinal clínico, a perda da função (*functiolaesa*) (ROCHA e GARCIA, 2006). Em 1793, John Hunter, um cirurgião escocês, observou que a inflamação não é uma doença, e sim uma resposta inespecífica que tem um efeito salutar sobre seu hospedeiro (ROCHA e GARCIA, 2006).

A reação inflamatória foi caracterizada a partir de duas teorias postuladas: a teoria celular e a teoria humoral. A primeira preconizava que a resposta inicial partiria do sangue e dos fluidos tissulares, ricos em sistemas enzimáticos complexos, responsáveis por diversos eventos relacionados à reação inflamatória, enquanto que a segunda, postulada por Metchnikoff, preconizava que as células brancas que apareciam durante a reação inflamatória eram as responsáveis pela proteção do organismo contra as infecções. No entanto, o fato de a inflamação ser produzida por diferentes agentes e manter as mesmas características, sugerem que os mensageiros químicos gerados no local da reação causam os sintomas (ROCHA e GARCIA, 2006).

A inflamação é uma resposta celular e humoral de intensidade variável com repercussões locais, loco-regionais ou sistêmicas, em que a cascata de eventos desencadeada após uma agressão ou estímulo tem como resultado o aumento do calibre vascular, aumento da permeabilidade vascular, recrutamento de leucócitos, como resultado de uma interação complexa entre diferentes tipos celulares residentes no tecido e vários mediadores pró-inflamatórios. (NICKLOFF e NESTLE, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

O tempo de duração e a intensidade do agente inflamatório determinam diferentes graus ou fases de transformação nos tecidos. Categoricamente, a resposta

inflamatória é dividida em três distintas fases, sendo que cada fase é mediada aparentemente por diferentes mecanismos. Inicialmente, é evidenciada uma fase aguda, caracterizada por ser de duração variável e alterações vasculares (fluxo e calibre vascular, aumento da permeabilidade vascular), seguida de uma fase subaguda, em que nota-se, predominantemente, a infiltração leucocitária e de outras células fagocíticas (quimiotaxia, adesão, transmigração e fagocitose) e posteriormente, ocorre à fase crônica, onde a proliferação é fato de destaque, em que ocorre a regeneração tecidual e fibrose (SANTOS JUNIOR, 2003).

Primeiramente, os fenômenos vasculares predominam no foco da inflamação, onde ocorre um aumento da dilatação dos vasos e ainda, um aumento da permeabilidade capilar (CIRINO et al., 2003), gerados principalmente pelos seguintes mediadores: prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrienos, PAF, C5a, e substâncias liberadas localmente nas terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – CGRP) (HEDQVIST et al., 2000; LECCI et al., 2000). Este aumento da permeabilidade vascular culmina com a saída de exsudato, ou seja, um fluído rico em proteínas para o meio extravascular resultando em acúmulo deste, no local da lesão, o que caracteriza o edema (PATTERSON e LUM, 2001; LEY, 2002).

Posteriormente, evidencia-se uma fase sub-aguda em que ocorre o fenômeno da quimiotaxia, caracterizada por migração e infiltração leucocitária e de células fagocíticas, no sítio da lesão. (FRANGOGIANNIS et al., 2002). No local da lesão, ocorre o reconhecimento do agente agressor através de neutrófilos e macrófagos, após este reconhecimento, essas células englobam e o destroem (fagocitose) e liberam enzimas lisossomais a fim de destruir o agente agressor (RODRIGUES et al., 2002). Ainda no foco inflamatório, ocorre um importante evento: a ativação dos mastócitos e agregação plaquetária, que também resultam na liberação de mais mediadores quimiotáticos. Dentre os mediadores quimiotáticos citam-se: os prostanóides (PGI_2 , PGD_2 , PGE_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$), derivados da via da lipoxigenase (5-HETE, LTB_4), cininas, substâncias liberadas de neutrófilos ativados, entre outros (TAN et al., 1999).

As dermatites são dermatoses inflamatórias mediadas por fatores imunológicos locais ou sistêmicos, embora as causas de muitas delas permaneçam desconhecidas. Em geral, as lesões agudas permanecem por alguns dias a semanas e se caracterizam por inflamação, edema e, em algumas, lesão epidérmica, vascular e subcutânea (MURPHY, 2006).

Finalmente, após a fase sub-aguda, ocorre uma complexa série de eventos na tentativa de reconstituir o tecido danificado por meio da ativação de células mesenquimatosas (resposta primária), incluindo hiperplasia, hipertrofia, e produção de matriz extracelular. A injúria inflamatória (injúria secundária) é mantida e induz o processo de cicatrização (resposta secundária) que freqüentemente reconstitui o sítio lesado com tecidos fibroblásticos menos especializados (SUZUKI et al., 2003). A transição da inflamação aguda para a crônica ocorre quando não há uma resolução da resposta inflamatória aguda devido à persistência do agente nocivo ou há alguma interferência com o processo normal da cicatrização (CONTRAN, KUMAR e COLLINS, 2006).

O *screening* de compostos com propriedades antiinflamatórias é possível graças a uma infinidade de técnicas *in vitro* (cultura de células e dosagem de mediadores inflamatórios; inibição de enzimas) e *in vivo* (indução de inflamação por substâncias denominadas agentes flogísticos ou irritantes em modelos animais variados), amplamente utilizados na pesquisa pré-clínica (SARAIVA, 2009). A indução de edema em orelhas de camundongos por diferentes substâncias irritantes oferece uma boa avaliação sobre a eficácia de produtos naturais e outras drogas sobre o processo inflamatório tópico. Esse modelo possui muitas vantagens, tais como: rapidez e simplicidade; reprodutibilidade e baixa possibilidade de erro (GÁBOR, 2000).

Produtos naturais utilizados na medicina tradicional tem demonstrado potencial *antiinflamatório* tópico *in vivo*, tais como o óleo-resina de *Copaifera duckei* (copaíba) (CARVALHO et al., 2005), óleos das sementes de *Helianthus annuus* (girassol) e *Vitis vinifera* (uva) (NABAS et al., 2009) e o óleo de *Boa constrictor* (Jiboia) (FALODUN et al., 2008). A aplicação tópica do óleo fixo do lagarto *Tupinambis merianae* revelou atividade significativa sobre o processo inflamatório, causando redução do edema de orelha induzido por óleo de cróton (aplicação simples e múltipla), ácido araquidônico e fenol. As concentrações do OTM a 2, 4, 8 mg/orelha demonstraram inibição máxima de 8%, 25% e 45% frente ao edema de orelha causado pelo óleo de cróton (aplicação simples) (FERREIRA et al., 2010).

Os resultados promissores encontrados nesses estudos demonstram a possibilidade da utilização de animais medicinais como forma alternativa de tratamento de doenças como as dermatites, responsáveis por inflamações tópicas.

ÓLEOS FIXOS: ESTRUTURA, FUNÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Óleos e gorduras são misturas complexas de ácidos graxos, ésteres de ácidos graxos, mono-, di- e triglicerídeos e componentes minoritários, tais como vitaminas, esteróis, fosfolipídeos, pigmentos e hidrocarbonetos (CARVALHO, 2011). Os óleos fixos são solúveis nos solventes orgânicos usuais, tais como clorofórmio, benzeno e hexano e são insolúveis na água (PEREIRA, 2009). Quimicamente, óleos e gorduras (animal e vegetal) consistem de moléculas de triacilgliceróis (TG), as quais são constituídas de três moléculas de ácidos graxos (AG) de cadeia longa ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol (Figura 3, p. 40) (GERIS et al., 2007).

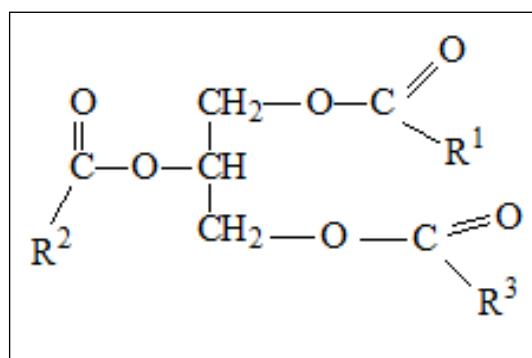


Figura 3 – Modelo estrutural de um triacilglicerol

Onde: R^1 , R^2 , R^3 são unidades de ácidos graxos.

Os glicerídeos dos ácidos de peso molecular médio e elevado são praticamente inodoros e insípidos; os dos ácidos de peso molecular baixo apresentam características sensoriais particulares (cor, cheiro, sabor, etc.). Devido aos seus altos pontos de ebulição e baixa pressão de vapor não é possível separá-los por destilação simples sem se decomporem, nem são destiláveis pelo vapor de água. Esta propriedade explica o qualitativo de “óleos fixos” que lhes foi atribuída (BRUNETON, 1995).

Óleos e gorduras possuem diversas aplicações comerciais como na indústria de cosméticos, alimentos ou biocombustíveis (SINGH & SINGH, 2010). As gorduras animais como a banha, o sebo comestível e a manteiga, são constituídas por misturas de triacilgliceróis, que contém um número de saturações maior do que o de insaturações,

conferindo-lhes maior ponto de fusão (sólidos à temperatura ambiente). De maneira análoga, os óleos por possuírem um número maior de insaturações, expressam menor ponto de fusão (líquidos à temperatura ambiente) (BITTENCOURT, 2009). Portanto os ácidos graxos saturados são encontrados principalmente em gorduras animais, sendo os mais comuns o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0) (SOUZA & VISENTAINER, 2006).

As propriedades físico-químicas e biológicas dos óleos e gorduras dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes nas moléculas dos triacilgliceróis. (SOLOMONS; FRYHLE, 2002). Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos obtidos, geralmente, da hidrólise de óleos e gorduras. Estes são classificados em saturados, monoinsaturados e poliinsaturados, dependendo da presença e número de duplas ligações na cadeia dos ácidos graxos (CARVALHO et al., 2003). A principal diferença entre essas moléculas está no comprimento de cadeia hidrocarbonada, no número e posições das ligações duplas e na configuração *cis* e *trans* (MORETO e FETT, 1989; LEHNINGER et al., 2000). A diferença de tamanho, grau e posição da insaturação nas suas estruturas lhes conferem propriedades físicas, químicas e nutricionais diferentes (MOREIRA et al., 2002).

Os ácidos graxos podem ser descritos por uma notação abreviada, em que o primeiro número está relacionado com a quantidade de átomos de carbono. Separado por dois pontos vem o número de duplas ligações e, por fim, a posição das duplas ligações, contando-as a partir da carboxila. Por exemplo, o ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado de 20 átomos de carbono, pode ser descrito como 20:4 (5,8,11,14) ou C20:4 (5,8,11,14) ou C20:4 (CONN & STUMPF, 1980). A estrutura química, fórmula e o nome de alguns tipos de ácidos graxos presentes em óleos e gorduras (Tabela 2, p. 42).

Tabela 2 – Características de alguns ácidos graxos comuns.

Ácido Graxo	Nome sistemático	Estrutura *(xx:y)	Formula
Láurico	Dodecanóico	12:00	C ₁₂ H ₂₄ O ₂
Mirístico	Tetradecanóico	14:00	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
Palmitico	Hexadecanóico	16:00	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
Esteárico	Octadecanóico	18:00	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
Arachidico	Eicosanóico	20:00	C ₂₀ H ₄₀ O ₂
Behenico	Docosanóico	22:00	C ₂₂ H ₄₄ O ₂
Lignocérico	Tetracosanóico	24:00	C ₂₄ H ₄₈ O ₂
Oléico	Cis-9-Octadecenóico	18:1	C ₁₈ H ₃₄ O ₂
Linoléico	Cis (9, 12) Octadecadienóico	18:2	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
Linolênico	Cis (9, 12, 15) Octadecatrienóico	18:3	C ₁₈ H ₃₀ O ₂
Erúcico	Cis-1-Docosenóico	22:1	C ₃₂ H ₄₂ O ₂

*xx:y indica xx carbonos do ácido graxo com y ligações duplas. Fonte: retirado de BALAT, 2008.

Os ácidos graxos linoléico e α -linolênico são considerados essenciais para os mamíferos, pois são precursores necessários para a síntese de outros ácidos e precisam ser obtidos por meio da dieta. Uma vez ingeridos eles podem ser convertidos em outros ácidos poliinsaturados como o EPA (Eicosapentaenóico, 22:5n-3), DHA (Docosahexaenóico, 22:6n-3) e Araquidônico (20:4n-6) (Nelson & Cox, 2002), que participam de numerosas funções celulares tal como a integridade e fluidez das membranas, atividade das enzimas de membrana e síntese de eicosanóides como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estes, por sua vez, possuem capacidade de modificar reações inflamatórias e imunológicas, alterando funções leucocitárias e acelerando o processo de granulação tecidual (FAVACHO, 2009).

Extração por solvente orgânico

A separação de compostos de produtos naturais pode ser conseguida pela transferência destes de uma fase para outra (sólido-líquido, líquido-líquido) (GUEDES, 2006). A extração por solvente utiliza as diferenças em interações intermoleculares na fase líquida (RYDBERG, 1992; WENNERSTEN, 1992). Nesse método, duas fases estão em contato íntimo e o(s) soluto(s) pode(m) se difundir do sólido para a fase líquida, resultando na separação dos componentes contidos originalmente no sólido (GEANKOPLIS, 2003).

O material a ser submetido à extração é previamente triturado e laminado a fim de facilitar a penetração do solvente, uma vez que, deste modo, além de estar contido no interior das células (sendo removido por difusão), também estará em forma de uma camada em volta das partículas do material, sendo removido por simples dissolução (MORETTO; FETT, 1998). Isto significa que o processo constitui-se em duas etapas: uma primeira, rápida e fácil, de dissolução, e outra mais demorada, de difusão, e por isso, considerada a etapa limitante. Como resultado, tem-se uma extração com velocidade elevada no início e em seguida, decrescente, não se atingindo uma remoção completa, na prática (MORETTO; FETT, 1998).

Um solvente ideal para a extração de óleos deve apresentar as seguintes propriedades: a) ter alta solubilidade em óleo em baixas temperaturas; b) ter alta seletividade pela substância a ser extraída, no caso, os triglicerídeos; c) ser inerte quimicamente, evitando reações paralelas e protegendo os equipamentos; d) ter baixa viscosidade e tensão de superfície para garantir boa percolação e umedecimento superficial; e) ser facilmente removido por completo do farelo e do óleo, com baixa demanda energética; f) ser imiscível em água, que deve ser facilmente removida; g) possuir baixo ponto de ebulição e baixo calor de evaporação; e i) ser pouco poluente (BOCKISCH, 2006). O hexano é o solvente orgânico mais utilizado no processo de extração, por ser o mais seletivo aos compostos polares, possuir estreita faixa de ebulição e ser imiscível com a água, o que evita misturas azeotrópicas (MORETTO & FETT, 1998).

O extrator em si é o principal elemento de qualquer processo de extração. Deve transportar as partículas e oferecer adequado tempo de residência em contato com o solvente (TANDY, 1991). O método de extração Soxhlet foi criado em 1879 por Franz Von Soxlet, para extração de lipídeos a partir de um material sólido. Este método utiliza aparelho de soxhlet que permite a extração de lipídeos através da continua passagem de um solvente através da amostra (CORREIA, 2009), tendo como características:

- O extrator utiliza o refluxo do solvente;
- Uso de amostras sólidas;
- A amostra não fica em contato direto com o solvente em ebulição.

Interferência de ácidos graxos sobre o processo inflamatório

O efeito dos ácidos graxos no processo inflamatório tem sido estudado desde 1929, quando foram realizadas as primeiras observações de lesões de pele provocadas por uma deficiência nos níveis de ácidos graxos essenciais nos alimentos que eram preparados (MARQUES et al., 2004).

Dentre os diversos ácidos graxos presentes no plasma, são particularmente importantes, os ácidos graxos poliinsaturados. Estes podem modular interações célula-célula e a sinalização intracelular. Desta forma, a alteração de fosfolipídeos da membrana, quanto a composição de ácidos graxos, pode modular a sua fluidez, o que modifica a ligação de citocinas aos seus específicos receptores. Os efeitos dos ácidos graxos em atenuar o processo inflamatório podem ocorrer de diversas maneiras: vasoconstrição, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação e morte celular, sendo que a maioria destes eventos ocorre sobre a via dos derivados do ácido araquidônico como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas (ZIBOH et al., 2000; O. SHEA et al., 2004; CALDER, 2003; POMPÉIA et al., 2000). Além disso, os ácidos graxos são precursores primários de mediadores lipídicos importantes durante o processo inflamatório, como ácido araquidônico (AA), prostaglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT) (O.SHEA et al., 2004; CALDER, 2003).

A ingestão de ácidos graxos ômega-3 pode ocasionar diminuição do processo inflamatório ao diminuir a produção de interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8) em neutrófilos e macrófagos, reduzindo também a produção de eicosanóides (PG, LT, TX) e aumento da resposta proliferativa linfocitária (POMPÉIA et al., 2000).

O ácido oleico exerce importante função na indução da expressão de genes em linfócitos B, envolvidos na defesa e reparo, fatores de transcrição, proteínas quinases relacionadas na sinalização celular e síntese de DNA (VERLENGIA et al., 2003).

Em estudo realizado por Cardoso et al. (2004), foi avaliada a influência da administração tópica dos ácidos α -linolênico (n-3), linoléico (n-6) e oleico (n-9) no processo de cicatrização de feridas em ratos. Os autores observaram que animais tratados topicamente com ácidos oléico e linoléico apresentaram redução significativa da área do ferimento a partir do quinto dia de tratamento e inibição da produção de óxido nítrico local, nas primeiras 48 horas pós-cirúrgica. Neste estudo foi sugerido um potencial terapêutico importante dos ácidos linoléico e oléico no processo de cicatrização.

GÊNERO *LEPTODACTYLUS*: ISOLAMENTO E AVALIAÇÃO DE MOLÉCULAS BIOATIVAS COM POTENCIAL TERAPÊUTICO

O gênero *Leptodactylus* contém 89 espécies que são distribuídas na América do Sul, principalmente no Brasil e Antilhas (FROST, 2011). A partir de levantamento bibliográfico realizado no Scielo, PubMed, BioMed, Bireme, SciencDirect, Web of Science e Scholar Google, foram obtidos artigos científicos que relatam os peptídeos antimicrobianos isolados desse gênero e suas principais atividades biológicas. A pesquisa foi realizada utilizando as palavras-chave: Gênero *Leptodactylus*, anfíbios, peptídeos antimicrobianos, secreção da pele. O resultado desse levantamento está mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 – Peptídeos antimicrobianos obtidos do gênero *Leptodactylus* descritos na literatura, com suas respectivas atividades.

Espécie	Peptídeo antimicrobiano	Potencial terapêutico	Referências
<i>L. ocellatus</i>	ocelatinas 1, 2 e 3	Antibacteriana e hemolítica	Nascimento et al. (2004)
	ocelatina 4	Antibacteriana	Nascimento et al. (2007)
	ocelatinas -5 e -6	Antibacteriana	Leite Jr, et al. (2010)
<i>L. fallax</i>	falaxina	Antibacteriana e hemolítica	King et al. (2005); Rollins-Smith et al. (2005)
<i>L. pentadactylus</i>	pentadactilina	Antibacteriana e hemolítica	King et al. (2005)
	leptoglicina	Antibacteriana	Sousa et al. (2009)
	leptoxina	Toxicidade em ratos	Limaverde et al. (2009)
<i>L. laticeps</i>	laticeptina	Antibacteriana	Conlon et al. (2006)
<i>L. syphax</i>	sifaxina	Antibacteriana	Dourado et al. (2007)
<i>L. validus</i>	ocelatinas -V1, -V2 e – V3	Antibacteriana	King et al. (2008)

Considerando a variedade estrutural e funcional desses peptídeos, a pele de anfíbios, especialmente anuros, é considerada uma rica fonte de peptídeos com potencial para servir como modelos para a produção de novos fármacos (PRATES et al., 2004; BRAND et al., 2006). Esta variabilidade de peptídeos ativos identificados na secreção de anfíbios parece estar relacionada com a diversidade de patógenos com os quais estes animais mantêm contato.

Peptídeos antimicrobianos exibem uma capacidade, *in vitro*, de matar rapidamente microrganismos e possuem um amplo espectro de atividade contra vários alvos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2001; ZASLOFF, 2002), fungos (KIEFFER et al., 2003; GOMES et al., 2005), parasitas (ARRIGHI et al., 2002), vírus (ZHANG et al., 2002) e células tumorais (ROZECK et al., 2000; CHEN et al., 2001; LINDHOLM et al., 2002). A ação dos peptídeos antimicrobianos não é limitada a exclusivamente matar microrganismos. Além disso, eles possuem uma impressionante variedade de adicionais efeitos biológicos importantes para respostas inflamatórias, imunidade inata e imunidade adaptativa (HANCOCK & DIAMOND, 2000; BROWN & HANCOCK, 2006).

As ocelatinas 1, 2 e 3 foram os primeiros peptídeos antimicrobianos isolados de espécies do gênero *Leptodactylus*, esses PAMs foram caracterizados a partir da secreção cutânea, obtida através de estimulação elétrica, da pele de *L. ocellatus* (NASCIMENTO et al., 2004). As ocelatinas constituem grupo de moléculas catiônicas de 21 a 25 resíduos de aminoácidos e possuem de 44 a 82% de similaridade entre si. Possuem C-teminal amidado que muitas vezes aumenta a atividade lítica do peptídeo, diminui a susceptibilidade do peptídeo a degradação por carboxipeptidases e estabiliza as conformações de α -hélice. As ocelatinas inibem o crescimento da bactéria Gram-negativa *Escherichia coli* a concentrações milimolar e apresentam atividade hemolítica contra eritrócitos humanos (NASCIMENTO et al., 2004).

Um estudo recente caracterizou uma nova ocelatina de *L. ocellatus*. A ocelatina 4 é diferente dos outros peptídeos antimicrobianos (PAMs) isolados da secreção da pele de rãs, ela é um peptídeo neutro em pH 7.0 e interage preferencialmente com membranas de células do sangue. No entanto, isso também significa que o peptídeo possui pouca afinidade para cargas negativas nas membranas bacterianas, o que explica sua fraca atividade antibacteriana: o MIC obtidos para ambas as *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 25923 foi de 64 mM. (NASCIMENTO, 2007).

O peptídeo antibacteriano falaxina, isolado da rã *L. fallax* é um peptídeo formado por 25 resíduos de aminoácidos, fracamente carregado (+ 2,18 a pH 7.0) e possui um C-terminal amidado (Tabela 4, p. 47). O peptídeo demonstrou atividade moderada contra várias cepas de bactérias Gram-negativas *E. coli* (40 µM), *Pseudomonas aeruginosa* (80 µM), *Klebsiella pneumoniae* (80µM), *Enterobacter cloacae* (20µM) e *P. mirabilis* (>160µM). O peptídeo não foi ativo contra bactéria Gram-positiva *S. aureus* e contra levedura *Candida albicans* em concentrações abaixo de 160 µM e apresentou atividade hemolítica muito baixa (somente 10% de hemólise a uma concentração de 200µM) (ROLLINS-SMITH et al., 2005).

Tabela 4 – Estruturas primárias de peptídeos antimicrobianos isolados da pele de rãs pertencentes ao gênero *Leptodactylus*. Todos os peptídeos são C-terminal α -amidada.

Peptídeos antimicrobianos	Estrutura primária
ocelatina – 1	GVVDILKGAGKDLLAHLVGKISEKV
ocelatina – 2	GVLDIFKDAAKQILAHAAEKQI
ocelatina – 3	GVLDILKNAAKNILAHAAE QI
ocelatina – 4	GLLDFVTGVGKDIFAQLI KQI
ocelatina – 5	AVLDILKDVGKGLLSHFMEKV
ocelatina – 6	AVLDFIKAAGKGLVTNIMEKVG
Falaxina	GVVDILKGAAKDIAGHLASKVMNKL
Laticeptina	GVVDILKGAAKDLAGHLATKVMNKL
Pentadactilina	GLLDTLKGAACKNVVGSLSASKVMEKL
Sifaxina	GVLDILKGAAKDLAGHVATKVINKI
Leptoglicina	GLLGGLLGPLLGGGGGGGGGGLL
Leptoxina	–
ocelatina – V1	GVVDILKGAGKDLLAHALSKLSEKV
ocelatina – V2	GVLDILKGAGKDLLAHALSKISEKV
ocelatina – V3	GVLDILTGAGKDLLAHALSKLSEKV

Outro peptídeo a pentadactilina purificado da secreção de pele *L. pentadactylus*, apresentou atividade antibacteriana contra várias cepas de bactéria Gram-positiva (*S.*

epidermidis - 100µM) e Gram-negativa (*E. coli* – 25 µM, *Enterobacter cloacae* - 50 µM, *P. aeruginosa* - 100 µM, *K. pneumoniae* -100 µM) e fraca atividade hemolítica com uma concentração >400µM (KING et al., 2005). O peptídeo laticeptina (*L. laticeps*) (CONLON et al., 2006) apresentou atividade contra bactérias Gram-negativas e a sifaxina (*L. syphax*) (DOURADO et al., 2007) apresentou excelente atividade inibitória contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus* ATCC 29213 e a Gram-negativa *E. coli* ATCC 25922 e não possui efeito citolítico.

Recentemente, os PAMs denominados ocelatinas -V1, -V2 e -V3, foram isoladas da secreção da pele de *L. validus*. Esses peptídeos possuem baixa atividade antimicrobiana, provavelmente em consequência de sua baixa anfipacidade e redução da cationicidade quando comparada com outros membros ativos de PAMs de espécies do gênero *Leptodactylus* (KING et al., 2008).

Uma nova nomenclatura estabelecida por Conlon, (2008) tem sido proposta com o objetivo de padronizar terminologia dos PAMs lineares que forma α -helice isolados de espécies do gênero *Leptodactylus*, levando em consideração de que esses peptídeos estão evolutivamente relacionados. Foi sugerida a utilização do nome das ocelatinas, por terem sido os primeiros PAMs de *Leptodactylus* a serem isolados e caracterizados, além de possuírem importantes semelhanças estruturais com os demais componentes da família. Dessa forma, os nomes foram mudados de falaxina por ocelatina -F1, pentadactilina para ocelatina -P1, laticeptina para ocelatina -L1, sifaxina por ocelatina -S1 e os peptídeos parálogos de *L. validus* foram nomeados como ocelatinas -V1, -V2 e -V3.

O peptídeo leptoglicina isolado a partir da secreção da rã *L. pentadactylus* apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* ATCC 9027, *E. coli* ATCC 28922, *C. freundii* ATCC 8090 com valores de MIC de 8,0 mM, 50,0 mM e 75,0 mM, respectivamente. Por outro lado, nenhuma atividade foi observada para bactérias Gram-positivas *S. Aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29912 e *M. luteus* ATCC 9341. A leptoglicina também foi testado contra fungos patogênicos humanos: *C. albicans*, *C. tropicalis*, e em *M. canis* e *T. Rubrum*, onde nenhum desses fungos mostraram inibição do crescimento na presença da leptoglicina. Nenhuma atividade hemolítica foi observada na concentração de 2-200 mM (SOUSA et al., 2009).

Outro exemplo de peptídeo antimicrobiano é leptoxina uma toxina protéica isolada a partir da secreção da pele da rã *L. pentadactylus*. Através de ensaios

farmacológicos realizados com a leptoxina Limaverde et al. (2009) puderam comprovar que esta toxina é uma das mais letais conhecidas até a presente data, induzindo a morte súbita por colapso cardiorrespiratório após injeção i.v. (DL_{50} $0,5 \pm 0,03$ mg/kg, i.v., ratos). No entanto, apesar da sua toxicidade forte via i.v. a leptoxina, não é ativa por via oral em doses 100 vezes maior que a DL_{50} .

Recentes estudos desenvolvidos com a rã *L. ocellatus* puderam comprovar a presença das ocelatinas -1, -2, -3, -4, -5 na secreção deste anfíbio, sendo que os três primeiros peptídeos já foram descritos no trabalho desenvolvido por Nascimento et al. (2004). Foi demonstrada a inibição do crescimento de linhagens padrão de microrganismos Gram-negativos e positivos com os seguintes CIMs para ocelatinas -5 e -6: *E. coli*, 64 e 32 mg/mL, respectivamente; e *S. aureus*, 128 e 64 mg/mL, respectivamente (LEITE JR, et al., 2010).

A descoberta e a realização de trabalhos com novas substâncias com propriedades antimicrobianas são muito importantes para a descoberta de novas classes de antibióticos, especialmente no contexto de crescimento a resistência microbiana a convencionais antibióticos. Portanto, a Investigação, purificação, caracterização química e biológica de novas moléculas provenientes de anfíbios brasileiros são importantes uma vez que a própria evolução tratou de selecionar um amplo espectro de substâncias eficiente na defesa dos organismos contra infecções.

DESCRIÇÃO ZOOLÓGICA

Leptodactylus macrosternum Miranda-Ribeiro, 1926

Leptodactylus macrosternum pertence ao grupo *Leptodactylus ocellatus* (Linnaeus, 1758), que é composto por seis espécies e que apresenta vários problemas taxonômicos importantes, como a relação entre *L. macrosternum* e *L. chaquensis* consideradas espécies-irmãs, morfologicamente indistinguíveis (DE LA RIVA & MALDONADO, 1999).

A espécie *L. macrosternum* (Figura 4, p. 50) é largamente distribuída em toda a América do sul, leste dos Andes, e ocorre da Venezuela à Argentina, incluindo Brasil (ANDRADE et al., 2012), onde é conhecida popularmente como caçote (BORGES-LEITE, 2008). É considerada uma espécie generalista, que está bem adaptada aos

ambientes perturbados e habita desde ambientes secos abertos a florestas tropicais úmidas (HEYER et al., 2008). Sua reprodução acontece em lugares onde há poças de água temporárias, local onde é frequentemente encontrada e também em pequenos lagos e locais inundados. A desova é depositada em um grande ninho de espuma na superfície da água. É considerada como de hábitos terrestres (HEYER, 2010).



Figura 4 – A espécie *Leptodactylus macrosternum*. Fonte: Ávila, R.W.

Apesar de sua ampla distribuição geográfica em diversas áreas do bioma caatinga (LOEBMANN e HADDAD, 2010) e a presença de estudos preliminares sobre predação (ANDRADE et al., 2012), endoparasitismo (GOLDBERG et al., 2002), e Aspectos Biológicos (DIXON & STATON, 1976), são escassos os trabalhos que abordam a utilização de produtos naturais obtidos de *L. macrosternum*.

Leptodactylus vastus Adolf Lutz, 1930

A espécie *Leptodactylus vastus* A. Lutz, 1930 (Figura 5, p. 51) é endêmica da América do Sul, ocorrendo especificamente no nordeste do Brasil. Ela ocorre em formações vegetacionais abertas, incluindo o domínio da Caatinga e a porção adjacente

norte do domínio do Cerrado (HEYER, 2005), tendo sido também registrada em fragmentos de mata atlântica no nordeste brasileiro (SANTANA *et al.*, 2008).



Figura 5 – A espécie *Leptodactylus vastus*. Fonte: Ávila, R.W.

L. vastus é conhecida popularmente como jia ou rã pimenta do nordeste e é encontrada principalmente em ambientes de água doce e terrestre (HEYER, 2008). Esta espécie pertence ao grupo “*pentadactylus*” constituído por espécies que depositam ninhos de espuma em depressões ou buracos nas margens ou perto de corpos de água e produzem girinos exotróficos, que são aqueles que se alimentam no período larval (HEYER, 1969; PRADO; UETANABARO, 2002). É considerada a maior espécie de anfíbio anuro do Brasil, podendo alguns indivíduos alcançar 25 cm de comprimento rostro-anal e pesar pouco mais de um quilo. Sua vocalização é bem característica, assemelhando ao latido de cão, porém com som um pouco rouco e abafado. É considerada uma espécie voraz, pois se alimenta de artrópodes e pequenos vertebrados, assim como de outras rãs, serpentes e pequenos roedores. (FREITAS & SILVA, 2007). Na época reprodutiva, geralmente na estação chuvosa, *L. vastus* é observada em áreas próxima a corpos d’ água temporários (DANTAS & DONATO, 2009).

Na literatura há registro de trabalhos sobre essa espécie que abordam diferentes aspectos: predação (GOUVEIA *et al.*, 2009), descrição morfológica de girinos

(VIEIRA et al., 2007), Toxicidade (HISSA et al., 2008; VIANA, 2010), Atividades Antimicrobiana, Larvicida, Hemaglutinante, Hemolítica e Surfactante (HISSA et al., 2008) e Cristalização de proteínas da pele (HISSA et al., 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DOS ANFÍBIOS

Os espécimes de *L. macrosternum* e *L. vastus* foram coletados (Autorização de coleta SISBIO - IBAMA: 154/2007 no. 27542-2, nº do processo 96683918), na Estação Ecológica de Aiuaba (06°36' - 06° 44'S e 40° 07' - 40° 19'O), localizada na microrregião do Sertão dos Inhamuns, estado do Ceará, Brasil, durante o mês de Maio de 2011, através do método de coleta ativa, de acordo com as técnicas descritas por Auricchio & Salomão (2002). As rãs foram anestesiadas através da associação entre Quetamina (60 mg/kg) e Xilazina (6 mg/kg) (VIANA, 2003) e sacrificadas para remoção de sua gordura corporal. Espécimes-testemunho foram fixadas com formol a 10% e em seguida depositadas na coleção herpetologica da Universidade Regional do Cariri/Laboratório de zoologia – URCA (Tabela 5, p. 52).

Tabela 5: Espécies depositadas na coleção herpetologica da URCA.

Espécie	Nº de Tombo
<i>Leptodactylus macrosternum</i>	LZ-1325
<i>Leptodactylus vastus</i>	LZ-1309

Materiais laboratoriais utilizados

As substâncias utilizadas durante os testes químico e microbiológico encontram-se relacionadas a seguir com suas respectivas procedências.

SUBSTÂNCIAS	ORIGEM
Ácido acético P.A.	Fluka, Alemanha
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®)	Syntec, Brasil
Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®)	Syntec, Brasil
Dimetilsulfóxido	Merck, Alemanha
Etanol P.A.	Dinâmica, Brasil
Metanol	Dinâmica, Brasil
Hexano	Dinâmica, Brasil
Brain Heart Infusion (BHI)	Merck, Alemanha
Neomicina	Sigma-Aldrich, USA
Gentamicina	Sigma-Aldrich, USA
Amicacina	Sigma-Aldrich, USA
Anfotericina <i>B</i>	Sigma-Aldrich, USA
Mebendazol	Lasa, Brasil
Nistatina	Teuto, Brasil
Metronidazol	Prati, Brasil
Resazurina sódica	Sigma-Aldrich, USA
Ácido Clorídrico	Dinâmica, Brasil
Hidróxido de Sódio	Dinâmica, Brasil
Etanol 70%	Dinâmica, Brasil
Éter etílico	Dinâmica, Brasil
Hidróxido de potássio	Vetec, Brasil
Clorofórmio	Dinâmica, Brasil
Sulfato de Sódio Anidro	Vetec, Brasil

Material permanente e equipamentos utilizados

Estão listados a seguir todos os equipamentos e materiais permanentes utilizados durante a execução dos ensaios biológicos assim como suas respectivas especificações.

EQUIPAMENTOS	MODELO/MARCA/QUANTIDADE
Balança Analítica de precisão	Metler Toledo AB204

EQUIPAMENTOS (Cont.)	MODELO/MARCA/QUANTIDADE (Cont.)
Banho Maria	100, Fanem Ltda.
Cronômetros digitais	LivStar
Extrator de Soxhlet	—
Materiais de biossegurança	—
Material cirúrgico	—
Paquímetro digital	Jomarca, Ref. N° 205509
Perfurador de couro (<i>punch</i>)	Circunferência de 6 mm Ø
Pipetas automáticas	Maxipette
Rotaevaporador	Fisatom
Seringas estéreis	(1 mL, 3 mL, 5 mL)
Autoclave de esterilização a vapor quente	—
Estufa de secagem e esterilização	—
Placas de microdiluição estéreis	—
Tubos Eppendorffs	—
Tubos Falcon	—
Vidrarias gerais	—

OBTENÇÃO DOS ÓLEOS FIXOS DE *L. MACROSTERNUM* (OLM) E *L. VASTUS* (OLV)

Os óleos fixos das gorduras localizada na região ventral das rãs foram obtidos por extração à quente durante 6 h (60° C) em aparelho de Soxhlet, usando hexano como solvente. Após a mistura ser decantada e filtrada, o hexano foi removido em rotaevaporador, com o uso de pressão reduzida, e temperatura controlada (70° C $\pm$ 2° C). A massa da gordura, volume dos óleos e o rendimento dos óleos obtidos são mostrados na (Tabela 6, p. 55).

Tabela 6 – Dados da obtenção dos óleos fixos nas espécies estudadas

Óleos	Massa fresca da gordura (g)	Volume dos óleos (mL)	Rendimento (%)
OLM	11,56	4,10	36,55
OLV	60,47	11,03	18,24

OLM: óleo fixo de *L. macrosternum*; OLV: óleo fixo de *L. vastus*.

IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos foram identificados indiretamente através dos seus correspondentes ésteres metílicos. Os óleos (0,2 g) foram saponificados por 30 minutos em refluxo com solução de hidróxido de potássio em metanol, seguindo o método descrito por Hartman & Lago (1973). Após o tratamento adequado e ajuste de pH, os ácidos graxos livres foram metilados com metanol por catálise ácida para a obtenção dos respectivos ésteres metílicos.

ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG/EM)

As análises para a caracterização química dos óleos foram realizadas por Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas (CG/EM) Hewlett-Packard, modelo 5971, usando-se coluna capilar não-polar DB-1, de sílica fundida (30 m x 0,25 mm i.d., película de 0,25 µm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 0,8 mL/min e modo de divisão. A temperatura do injetor e do detector foram 250 °C e 200 °C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 35 °C para 180 °C em 4 °C/min e em seguida 180 °C para 250 °C em 10 °C/min. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30 - 450 m/z. Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com os da base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro (Wiley, 229) e outros dois computadores utilizando índices de retenção como uma pré-seleção (Alencar et al.,

1984; Alencar et al., 1990), bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (STENHAGEN et al., 1974; ADAMS, 2001).

TESTE MICROBIOLOGICO: PREPARO DAS SOLUÇÕES A PARTIR DOS ÓLEOS

Preparo da solução inicial e das soluções de teste

No preparo da solução inicial, os óleos foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo observadas as seguintes proporções: 20mg dos óleos solubilizados em 1mL de dimetilsulfóxido (DMSO), para obter uma concentração inicial de 20mg/mL. Em seguida, esta solução foi diluída em água destilada atingindo concentração de extrato de 1024µg/mL e reduzindo a concentração de DMSO para 10% e a partir desta, efetuaram-se diluições seriadas 1:2, durante o teste microdiluição, obtendo-se as concentrações de extrato variando de 512 a 8µg/mL e DMSO para 5% de concentração.

Microorganismos

Os experimentos foram realizados com isolados clinicos de *Escherichia coli* (EC27), resistente a neomicina e gentamicina (baixo nível) e a tobramicina, amicacina e canamicina, *Staphylococcus aureus* 358 (SA 358), resistente a vários aminoglicosídeos e *Pseudomonas aeruginosa* (PA 22) (Tabela 7, p. 57). *E. coli* ATCC 10536, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 15442, e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362, foram usadas como controle positivo. Para a avaliação da atividade antifúngica foram testadas cepas de *Candida albicans* ICB 12 e *C. krusei* ATCC 6258 linhagem. Todas as linhagens foram mantidas em meio *Heart infusion Agar* slants (HIA, Difco). Antes dos ensaios, as células foram cultivadas durante a noite a 37 ° C em Brain Heart infusion (BHI, Difco).

Tabela 7 – Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.

Bactéria	Origem	Perfil de Resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Aztreonan, Amoxicilina, Ampicilina, Amicacina, Amoxilina, Cefadroxil, Cefaclor, Cefalotina, Ceftazidima, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Imipenem, Canamicina, Sulfametrim, Tetraciclina, Tobramicina
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	-	Ausência de resistência
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxacilina, Gentamicina, Tobramicina, Amicacina, Canamicina, Neomicina, Paramomicina, Butirosina, Sisomicina, Netilmicina
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	Ausência de resistência
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 22	Ponta de cateter	Polimixina B, Cefepime, Cftazidime, Imipenem, Ciprofloxacina, Piperacilina, Levofloxacina, Meropenem
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442	-	Ausência de resistência
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 4362	-	Ausência de resistência

Meios de cultura

Foram utilizados nos ensaios biológicos os seguintes meios de cultura: Agar Heart Infusion – HIA (Difco Laboratories Ltda.), Brain Heart Infusion broth – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%) (Acumedia Manufacturers Inc.). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante e esterelizados em autoclave de vapor quente.

Preparo e padronização de inóculos bacterianos

Culturas de bactérias ficaram mantidas a 4° C em HIA. Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 35° C por 24 horas. As linhagens foram repassadas para o meio citado e incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens replicadas a serem testadas foram inoculadas em Caldo de Coração e Cérebro (Brain Heart Infusion – BHI) na concentração recomendada pelo fabricante, e incubadas

nas mesmas condições citadas anteriormente. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas em BHI em concentração de 10% até a obtenção de 10^5 céls/mL (NCCLS, 2000).

Drogas

Os antibióticos Gentamicina, Amicacina, e Neomicina foram obtidos da Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO, USA. As drogas antifúngicas utilizadas foram Anfotericina B (Sigma Co., St. Louis, USA), Mebendazol (Lasa – Pharmaceutical Industries LTDA., Brazil), Nistatina (Laboratório Teuto brasileiro S/A, Brazil) e Metronidazol (Prati, Donaduzzi & Cia LTDA., Brazil). Todas as drogas foram dissolvidas em água estéril antes do uso.

Avaliação da Atividade Antimicrobiana: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios para a determinação da CIM do OLM e OLV foram efetuados através do método de microdiluição em caldo, com concentrações variando de 512 a 8 $\mu\text{g/mL}$.

CIM pelo método de microdiluição em caldo: Execução e Leitura dos Ensaios

Este método utiliza pequenos volumes de meio e de amostra, distribuídos em cavidades de microplacas estéreis. Na concentração de 1024 $\mu\text{g/mL}$, volumes de 100 μL foram diluídos seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. A última cavidade foi usada como grupo controle. As placas preenchidas foram incubadas a 35° C por 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996).

Para evidenciar a CIM das amostras, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v). Após a incubação, 20 μL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido a redução do pH da resazurina indicou o

crescimento bacteriano (MARKHAM, 1998; PALOMINO et al., 2002), auxiliando a visualização da CIM para bactérias, definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada. Para a determinação do crescimento ou inibição das linhagens fúngicas foi utilizado o método da turbidez, que indica que há crescimento dos fungos quando ocorre a turvação dos poços.

Avaliação da interferência dos óleos sobre a resistência aos antibióticos e antifúngicos: Execução e Leitura do Ensaio

Para avaliar os óleos como moduladores da ação antibiótica e antifúngica, a CIM dos antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina, neomicina e gentamicina) e antifúngicos (anfotericina B, mebendazol, nistatina e metronidazol) foram avaliados na presença e na ausência dos óleos em microplacas estéreis.

Os óleos foram misturados em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias (MIC/8). A preparação das soluções de antibióticos e antifúngicos foi realizada com a adição de água destilada estéril em concentração dobrada (2500 µg/mL) em relação a concentração inicial definida e volumes de 100 µL diluídas seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. Em cada cavidade com 100 µL do meio de cultura continha a suspensão bacteriana e fúngica diluída (1:10). Os mesmos controles utilizados na avaliação da CIM para os óleos foram utilizados (SATO et al., 2004, modificado). As placas preenchidas foram incubadas a 35° C por 24 horas e a leitura evidenciada pelo uso de resazurina sódica para bactérias e turbidez para fungos como citado anteriormente.

ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA TÓPICA ATRAVÉS DE MODELOS DE EDEMA DE ORELHA INDUZIDOS PELO ÓLEO DE CRÓTON

Neste ensaio foi avaliada a atividade antiinflamatória do OLM e OLV pelo modelo de edema de orelha em camundongos. Este modelo é amplamente utilizado para demonstrar a atividade tópica de substâncias bioativas em inflamações cutâneas (BLAZSÓ & GÁBOR, 1995; GÁBOR, 2000).

Aspectos éticos da pesquisa

O projeto com protocolos referentes a este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri (CEUA-URCA) com processo nº 03/2012.

OLM E OLV (Óleo de *Leptodactylus macrosternum* e Óleo de *Leptodactylus vastus*)

Para realização do teste farmacológico de edema de orelha, foi usado o OLM e OLV na concentração pura.

Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss, adultos, de ambos os sexos, pesando entre 20-30g, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e pela Faculdade Leão Sampaio (FLS), mantidos em caixas de propileno, a temperatura média de $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12/12 h, recebendo ração (Labina, Purina®) e água “*ad libitum*”. Os animais são monitorados no Biotério Experimental da Universidade Regional do Cariri – URCA, em conformidade com as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios (CARDOSO, 1998; 2001) e bioéticas (BAZZANO, 2006).

Drogas, reagentes e soluções

Tabela 8 – Drogas, Reagentes e Soluções utilizadas durante os procedimentos experimentais farmacológicos.

Drogas/Reagente/Soluções	Origem
Acetona P.A.	Dinâmica, Brasil
Dexametasona (Decadron®)	Ache, Brasil
Óleo de cróton	Sigma, EUA
Solução fisiológica de NaCl 0,9%	Farmace, Brasil

Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

Lapa, (2003) descreve o óleo de cróton é um agente flogístico que possui como constituintes químicos ésteres de forbol, sendo o TPA (ácido 13-acetato de 12-O-tetracanoilforbol) o agente com potencial irritante. Vários mediadores da inflamação são estimulados pela sua aplicação ocorrendo liberação de aníons vasoativos e de derivados do ácido araquidônico. Para avaliar a atividade tópica por tratamento agudo do OLM ou OLV neste modelo, grupos de camundongos Swiss ($n = 6$) tiveram suas orelhas direitas tratadas topicamente, com 20 μL de acetona, dexametasona 4 mg/mL (0,08 mg/orelha), OLM ou OLV puro esperando 30 minutos para absorção. Em seguida, 20 μL de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona foram aplicados topicamente na orelha direita e 20 μL do veículo acetona na orelha esquerda. Após 6 horas, os animais foram sacrificados por decapitação e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas através de um *punch* (perfurador de couro metálico) para avaliação do edema (TUBARO, 1985).

Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

No intuito de avaliar o efeito antiinflamatório do OLM e OLV em um processo inflamatório crônico, já estabelecido, foi utilizado um modelo com a aplicação múltipla do óleo de cróton. O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação de 20 μL de óleo de croton 5% (v/v) em acetona em dias alternados, durante 9 dias, em camundongos Swiss ($n = 8/\text{grupo}$). O OLM ou OLV puro e a dexametasona (0,08 mg/orelha, controle positivo) foram aplicados por via tópica durante 4 dias (2 vezes ao dia) a partir do 5º dia do experimento, sendo o edema avaliado diariamente através de medição da espessura da orelha direita com auxílio de um paquímetro digital. No 9º dia do experimento, os animais foram sacrificados por decapitação e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados para avaliação do edema (STANLEY et al., 1991).

Quantificação do edema

Para quantificar o percentual de inflamação em cada animal analisado, foram obtidos discos de 6 mm de diâmetro: um da orelha direita (tratada com agente irritante)

e outro da orelha esquerda (tratada com veículo do agente irritante). Em seguida, cada disco obtido teve sua massa mensurada com a utilização de balança analítica (Metler Toledo AB204). O edema de orelha, expresso em percentual de aumento da massa da orelha, foi calculado utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inflamação} = \frac{m_{od} - m_{oe}}{m_{oe}} \times 100$$

onde m_{od} é a massa (em gramas) do disco obtido da orelha direita e m_{oe} é a massa (em gramas) do disco obtido da orelha esquerda. O cálculo do efeito inibitório médio da inflamação (EIM, em %) de cada tratamento (Figura 9, p. 56), procedeu-se aplicando a fórmula a seguir:

$$\text{EIM (\%)} = \left[\frac{\text{MPE}_{\text{cont}} - \text{MPE}_{\text{trat}}}{\text{MPE}_{\text{cont}}} \right] \times 100$$

onde MPE_{trat} é a média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento com OLM, OLV ou controle positivo e MPE_{cont} é a média do percentual de edema do grupo controle negativo (tratado com salina ou acetona).

Análise estatística dos dados

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS FIXOS

As análises dos óleos fixos por CG/EM possibilitaram identificar diversos ésteres metílicos de ácidos graxos nas duas espécies estudadas. No óleo de *L. macrosternum* foi possível identificar 10 constituintes, representando 98,98 %, enquanto que no óleo de *L. vastus* 92,36 % dos componentes químicos foram identificados, perfazendo um total de doze constituintes (Tabela 9, p. 63).

Tabela 9 – Ésteres metílicos identificados nos óleos fixos da gordura corporal de *Leptodactylus macrosternum* (óleo I) e *Leptodactylus vastus* (óleo II), com as referidas percentagens.

Componentes	Óleo I		Óleo II	
	IR ^a	(%)	IR ^a	(%)
miristato de metila	1680	1,16	1680	1,42
pentadecanoato de metila	1779	0,53	1779	1,74
palmitoleato de metila	1878	31,52	1878	9,23
palmitato de metila	1978	0,75	1886	20,01
oleato de metila	2085	0,49	–	–
linoleato de metila	2077	16,46	2093	17,02
liso heptadecanoato de metila	–	–	1914	0,69
heptadecanoato de metila	–	–	1978	0,66
eicosenoato de metila	–	–	1986	0,93
elaidato de metila	–	–	2085	27,87
estearato de metila	2241	7,05	2241	10,01
5,8,11,14 – eicosatetraenoato de metila	2499	0,65	2308	2,51
4,7,10,13,16,19 – docosahexenoato de metila	–	–	2523	0,27
(8E,11E, 14E) – docosatrienoato de metila	2093	33,55	–	–
(E,E,Z) – 1,3,12 – nonadecatrieno – 5, 14 – diol	2308	6,82	–	–
Total identificado		98,98		92,36
Ésteres saturados		40		58,33
Ésteres insaturados		60		41,67

IR – Índice de retenção

O percentual de saturação encontrado para o OLM foi de 40 e 60 % de ésteres metílicos saturados e insaturados, respectivamente, tendo como constituintes majoritários o (8E, 11E, 14E) – docosatrienoato de metila (33,55%), palmitoleato de metila (31,52%), e linoleato de metila (16,46%). Por outro lado o OLV apresentou 58,33% de ésteres saturados e 41,67% de insaturados, tendo como principais compostos identificados o elaidato de metila (27,87 %), palmitato de metila (20,01 %), e linoleato de metila (17,02%).

O linoleato de metila, derivado do ácido linoléico foi identificado nos dois óleos em quantidades elevadas (16,46 % no OLM e 17,02 % no OLV). Este ácido é tido como essencial para os mamíferos em virtude de não ser sintetizado pelos mesmos, tendo que necessariamente ser obtido a partir da dieta para desempenhar funções vitais a manutenção do metabolismo (LIMA et al., 2004).

Entre os inúmeros ácidos graxos existentes, alguns são produzidos pelo organismo animal, porém outros não (VALENZUELA et al., 2000). Durante o processo de formação dos novos ácidos graxos, as enzimas biossintéticas dos animais podem inserir duplas ligações na posição *n*-9 ou superior. Entretanto, seu organismo é desprovido das enzimas dessaturases $\Delta 12$ e $\Delta 15$, capazes de inserir duplas ligações entre os carbonos 3-4 e 6-7 na porção terminal da molécula de ácido graxo (POMPÉIA, 2002). Por esta razão, ácidos graxos com duplas ligações nas posições *n*-3 e *n*-6 são pertencentes a classes individuais, sendo denominados “essenciais” (VELASCO, 2009).

Comparativamente, a presença de alguns constituintes em ambos os óleos encontra-se de acordo com o resultado observado por Lopes et al. (2010), em um trabalho realizado com óleo de *Rana catesbeiana* SHAW, extraído do tecido adiposo desse anfíbio. Nesse estudo os autores relataram a presença de alguns ácidos graxos como: ácido esteárico, linoléico, mirístico, palmítico e palmitoleico. O teor observado por estes autores para o ácido mirístico (1,8 %) foi praticamente igual ao encontrado em ambos os óleos. No entanto o percentual de ácido linoléico (25 %) foi superior quando comparado com o OLM (16,46 %) e o OLV (17,02 %).

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Quando testados isoladamente verificou-se que o OLM e OLV apresentaram atividade antimicrobiana frente a *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *C. krusei* ATCC 6258 respectivamente, com CIM 256 µg/mL para ambos (Tabela 10, p. 65). Entretanto para as demais cepas de *E. coli* ATCC 10532, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 4362 e *C. albicans* ICB 12 os dois óleos não demonstraram redução do crescimento microbiano com CIM ≥ 1024 µg/mL, sugerindo uma ineficiência dos óleos desses anfíbios contra infecções bacterianas.

Tabela 10 – Valores da CIM (µg/mL) dos óleos fixos de *Leptodactylus macrosternum* e *Leptodactylus vastus* frente a microorganismos padrão e multirresistente.

Microorganismos	CIM (µg/mL)	
	<i>L. macrosternum</i>	<i>L. vastus</i>
<i>E. coli</i> ATCC 10532	≥ 1024	≥ 1024
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥ 1024	≥ 1024
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4362	≥ 1024	≥ 1024
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	256	512
<i>C. albicans</i> ICB 12	≥ 1024	≥ 1024
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	512	256

CIM: Concentração inibitória mínima.

Os ácidos graxos podem mostrar atividade antibacteriana, principalmente os insaturados, por afetar a síntese bacteriana endógena de ácidos graxos (ZHENG et al., 2005). Os ácidos graxos, láurico, palmítico, linoléico, linolênico, esteárico, mirístico e caprílico são conhecidos por possuírem propriedades antibacterianas e antifúngicas (NOBRE et al., 2002; AGORAMMORTHY et al., 2007). Silva et al. (2011) demonstraram a eficiência do óleo de rã-touro (*Rana catesbeiana*), na inibição de diferentes microorganismos patogênicos. Estes autores relataram que esse produto natural demonstrou atividade antimicrobiana frente a todas as linhagens de microorganismos testados (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. guil-liermondii*), sugerindo esse óleo como um promissor agente antimicrobiano, principalmente pela relativa facilidade de obter esse produto em grandes quantidades.

Modulação da Atividade Antibiótica

Na atividade modificadora de antibióticos foi observada ausência de atividade inibitória quando combinou-se o OLM com os aminoglicosídeos frente a todas as linhagens bacterianas testadas. Entretanto, um efeito antagônico foi evidenciado na associação do OLV com a neomicina frente às cepas *S. aureus* 358 e *P. aeruginosa* 22 (Tabela 11, p. 66).

Tabela 11 – Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/mL}$) dos aminoglicosídeos sozinhos e em associação com os óleos fixos de *L. macrosternum* e *L. vastus*.

Antibióticos	<i>L. macrosternum</i>					
	CIM SA 358	OLM (32 $\mu\text{g/mL}$) + antibiótico	CIM EC 27	OLM (32 $\mu\text{g/mL}$) + antibiótico	CIM PA 22	OLM (32 $\mu\text{g/mL}$) + antibiótico
Amicacina	78,1	78,1	9,8	9,8	156,2	156,2
Neomicina	78,1	78,1	4,9	4,9	156,2	156,2
Gentamicina	9,8	9,8	2,4	2,4	39,1	39,1
Antibióticos	<i>L. vastus</i>					
	CIM SA 358	OLV (64 $\mu\text{g/mL}$) + antibiótico	CIM EC 27	OLV (64 $\mu\text{g/mL}$) + antibiótico	CIM PA 22	OLV (64 $\mu\text{g/mL}$) + antibiótico
Amicacina	39,1	39,1	9,8	9,8	156,2	156,2
Neomicina	9,8	78,1	2,4	2,4	39,1	156,2
Gentamicina	4,9	4,9	2,4	2,4	39,1	39,1

Na modulação dos antifúngicos, ambos os óleos não demonstraram atividade relevante do ponto de vista clínico, com valor da CIM $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$, frente a todas as linhagens de fungos testadas. Com base nesses dados sugerimos uma ineficiência do uso da gordura de *L. macrosternum* e *L. vastus* em associação com antibióticos e antifúngicos para o tratamento de doenças causadas por bactérias e fungos oportunistas.

Granowitz & Brown (2008) relataram a possibilidade de um efeito antagonista devido ao uso combinado de antibióticos, provavelmente resultado de quelação dos

mesmos. Efeito antagônico similar pode estar diminuindo a atividade dos aminoglicosídeos usados quando combinado com o OLV.

No que diz respeito à atividade modificadora da ação de antibióticos e antifúngicos poucos trabalhos mostram a ação de zoterápicos para essa finalidade. Ferreira et al. (2009b) avaliaram a atividade moduladora da gordura de *Tupinambis merianae* frente a linhagens bacterianas. Os resultados indicaram que a gordura corporal de *T. merianae* não aumentou a eficácia dos aminoglicosídeos contra as linhagens de bactérias testadas. A combinação da amicacina e neomicina com o óleo de *Tupinambis merianae* não revelou a potencialização da ação dos mesmos frente a *E. coli* 27 e *S. aureus* 358. No entanto a junção OTM com a canamicina e gentamicina, resultou num efeito antagônico desses aminoglicosídeos frente às linhagens testadas.

O uso de produtos naturais associados a medicamentos industrializados já foi documentado na literatura. Calvet-Mir et al. (2008) relataram o uso de produtos da medicina tradicional associados à medicina ocidental para o tratamento de diarreia, vômito e dores de estômago por indivíduos da etnia Tsimane' que habitam as províncias de Ballivian e Yacuma na Bolívia. Vandebroek et al. (2008) afirmaram que na comunidade rural de Quechua, na Bolívia, há o uso combinado de produtos naturais e medicamentos industrializados para o tratamento de doenças do trato respiratório e digestório. Esses dados mostram que algumas comunidades utilizam, simultaneamente, medicamentos naturais e industrializados.

Hunt & Vincent (2006) advertem que a bioprospecção de recursos naturais para a produção de novos fármacos pode resultar na exploração da biodiversidade, com impactos diretos e negativos sobre estas fontes. Portanto a realização de testes farmacológicos dos produtos oriundos de animais ameaçados ou não de extinção é de extrema importância, pois validar ou não essa prática e propor medidas para um uso racional e sustentável é imprescindível para a manutenção das espécies (ALBUQUERQUE et al, 2007; ALVES et al, 2009).

ATIVIDADE DO ÓLEO FIXO DE *L. MACROSTERNUM* E *L. VASTUS* NOS MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

A Figura 6 (p. 68) e Tabela 12 (p. 68) mostram que o OLM ou OLV puros não mostraram efeito antiedematogênico após 6 horas da aplicação tópica do óleo de cróton, quando comparados com o grupo tratado com acetona (controle negativo). Neste modelo, apenas o grupo tratado com o controle positivo, dexametasona (0,08 mg/orelha), demonstrou redução significativa quando comparado com o controle negativo, com efeito inibitório médio da inflamação de 65,08% ($p < 0,001$).

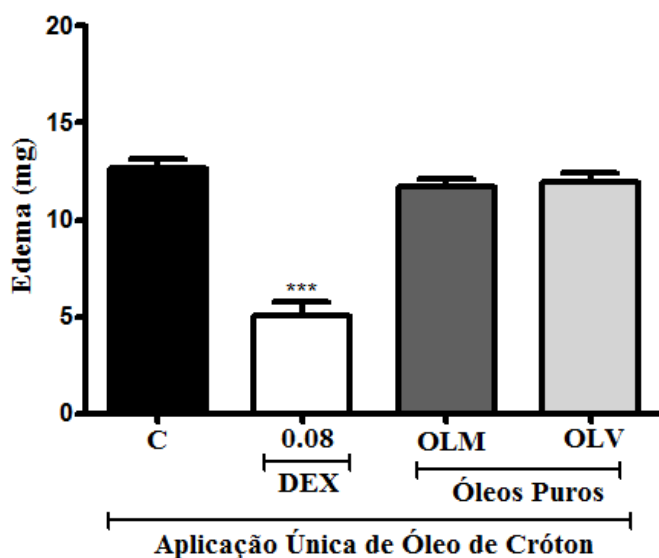


Figura 6 – Efeito do OLM ou OLV, administrados por via tópica, no edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton em camundongos. Os animais foram previamente tratados com o controle acetona(C), dexametasona 0,08 mg/orelha (DEX), OLM ou OLV (Puro) e após 15 minutos receberam topicamente óleo de cróton 5% (v/v) em acetona. Os gráficos representam a média do edema de orelha (%) e as barras verticais o E.P.M de 6 animais registrados após 6h da aplicação tópica do óleo de cróton. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e Teste de Student- Newman-Keuls).

Tabela 12 – Efeito do OLM e OLV sobre o edema induzido pela aplicação única de óleo de cróton.

Grupo	Dose (mg/mL)	Edema (mg)	Inibição (%)
Controle Negativo	–	12,6 ± 0,47	–
Dexametasona	8	4,4 ± 0,4***	65,08%
OLM	Puro	11,7 ± 0,39	7,14%
OLV	Puro	11,9 ± 0,50	5,55%

Valores expressos em média ± E.P.M. (*** $p < 0,001$ vs controle); (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

Dentre os vertebrados utilizados na medicina popular do Brasil, o grupo dos anfíbios é um dos menos citados (ALVES, 2009). Na literatura os poucos os trabalhos de levantamento etnofarmacológicos citam a espécie *L. vastus* como sendo utilizada para o tratamento de doenças como inflamações de garganta, tosse, asma, artrite e dor nas costas (FERREIRA et al., 2012; ALVES et al., 2011; ALVES & ALVES, 2011; BARBOSA et al., 2011), sendo a maioria destas doenças representam processos patológicos de origem inflamatória.

Vários modelos experimentais de inflamação podem ser utilizados para avaliar a atividade antiinflamatória de drogas. No presente estudo, foi analisado o possível efeito antiedematogênico do OLM e OLV, em modelos experimentais de inflamação aguda e crônica induzidos por óleo de cróton em camundongos *Swiss*. Estes modelos permitem identificar compostos com atividade antiinflamatória que possam ser potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias que acometem a pele, pois promovem condições que se assemelham com alguns tipos de dermatites observadas em humanos (BOUCLIER *et al.*, 1990).

A dexametasona, um glicocorticóide usado clinicamente no tratamento das desordens da pele, é conhecido por sua potente atividade antiinflamatória e imunossupressora, no entanto seu efeito tópico pode causar intensa atrofia da pele, um dos principais efeitos colaterais do seu uso em doenças crônicas (ASHWELL *et al.*, 2000).

O agente irritante óleo de cróton, extraído das sementes de *Croton tiglium*, tem como constituinte majoritário o 13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol (TPA) (LAPA, 2003). A aplicação tópica de TPA é considerada um modelo válido na busca de compostos que sejam eficazes como antiinflamatórios tópicos. Quando aplicado topicamente na pele de camundongos, o TPA promove indução de estresse oxidativo ou produção de espécies reativas de oxigênio, inflamação cutânea e subsequentemente pode ocorrer hiperplasia epidermal (RAHMAN et al., 2008). O TPA por via tópica gera uma resposta inflamatória aguda que apresenta vasodilatação, infiltração de leucócitos polimorfonucleares para o tecido e formação de edema (GARG et al., 2008; GARBOR, 2000).

Estudos afirmam que a inflamação aguda induzida pela aplicação tópica de TPA ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, resultando em migração de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), liberação de histamina e serotonina e moderada síntese de eicosanoides (6-ceto-PGF₁ α , PGE₂ e

LTB₄) (PUNGERÓ et al., 1998; BADILLA et al, 2007). O mecanismo pelo qual o TPA exerce seu efeito é devido à ativação da Proteína quinase C (PKC), bem com da ativação seqüencial da via MAP quinase (MAPK), fosfolipase A₂ (PLA₂), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação do edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA *et al.*, 2006; DE BERNARDIS *et al.*, 1994). O TPA também parece induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos da pele, desencadeando o processo inflamatório (WILMER et al., 1994; REDONDO et al, 1997).

O edema de orelha induzido por óleo de cróton é um modelo bem estabelecido para a investigação dos efeitos de compostos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (TOWBIN et al., 1995). Fármacos inibidores das COX e 5-LOX, antagonistas de LTB₄, inibidores seletivos de iNOS e corticoesteroides podem demonstrar ação anti-inflamatória tópica, com redução significativa do edema em modelos animais de inflamação cutânea induzido por óleo de cróton ou TPA (MURAKAWA et al, 2006; MEDEIROS et al., 2009).

Nabas et al. (2009) avaliaram a ação óleo de peixe aplicado de forma tópica usando o modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton. Foi observado nesse ensaio que o grupo de animais (n=10) tratado topicamente como o óleo de peixe não demonstraram redução significativa do edema em comparação com o grupo controle negativo, com percentual de inibição de 7,3%.

Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

Conforme demonstrado na Figura 7 (p. 71), Figura 8 (p. 72) e a Tabela 13 (p. 72), a aplicação tópica do OLM ou OLV (Puros, 2 vezes ao dia, durante 4 dias) na orelha dos camundongos promoveu uma significativa redução em relação ao controle negativo. O controle negativo apresentou um edema de $15,0 \pm 0,96$ mg. A dexametasona, o OLM e OLV demonstraram diminuição significativa de $6,6 \pm 1,17$ mg ($p < 0,001$), $6,3 \pm 0,89$ mg ($p < 0,001$), e $5,1 \pm 0,94$ mg ($p < 0,001$) respectivamente,

com um percentual de inibição de 56% para dexametasona, 58% para o OLM e 66% para o OLV.

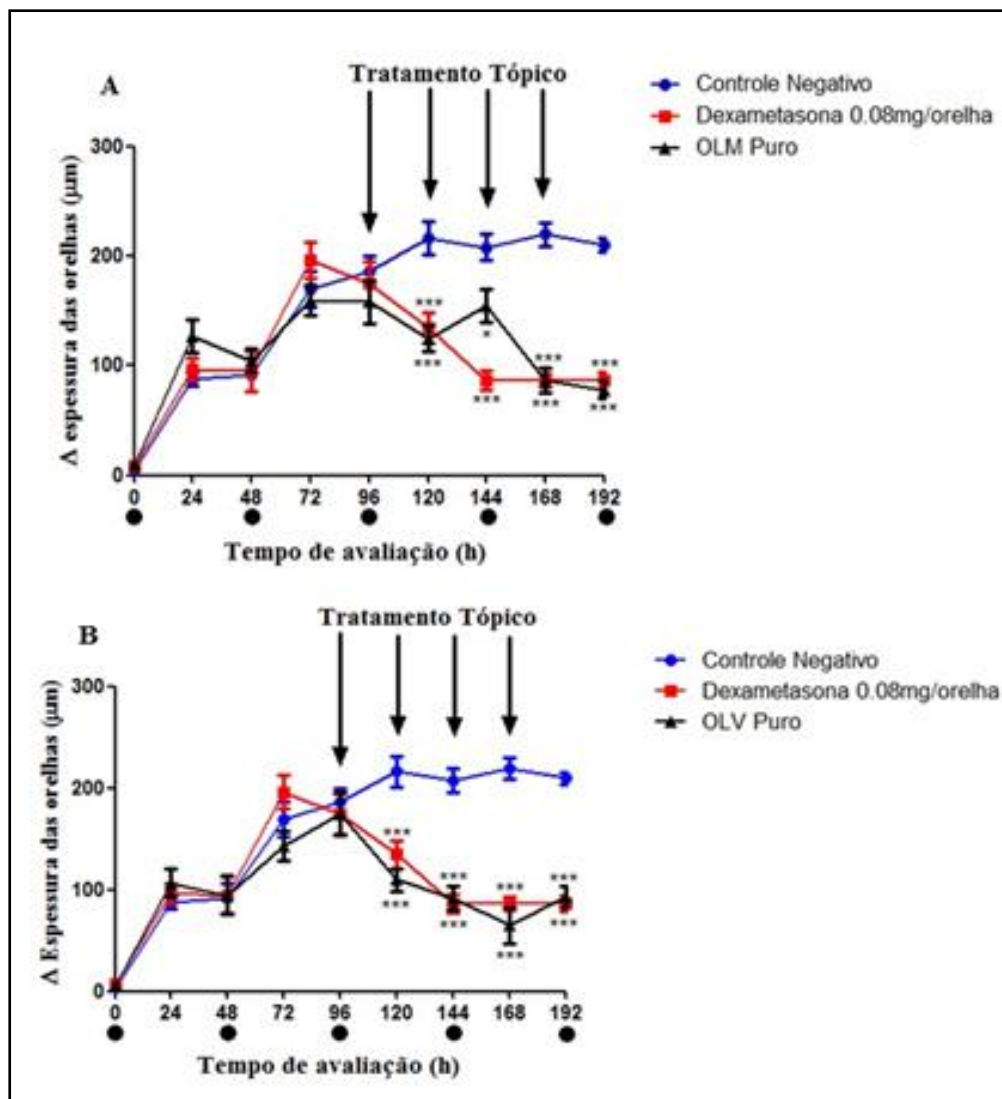


Figura 7 – Curvas tempo-resposta do efeito do tratamento com OLM (A) ou OLV (B) puros no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss. O experimento foi conduzido em 9 dias. Os animais receberam óleo de cróton em acetona na orelha direita em dias alternados indicado pelos pontos pretos e o veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha (μm) foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação de OC), a orelha dos animais recebeu veículo salina, dexametasona (DEX), OLM ou OLV bruto (20 μL, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 3 dias posteriores (setas apontam os dias em que houve tratamento). O efeito antiedematogênico dos compostos foi verificado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E.P.M. (*P < 0,05; *** p < 0.001 vs veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni).

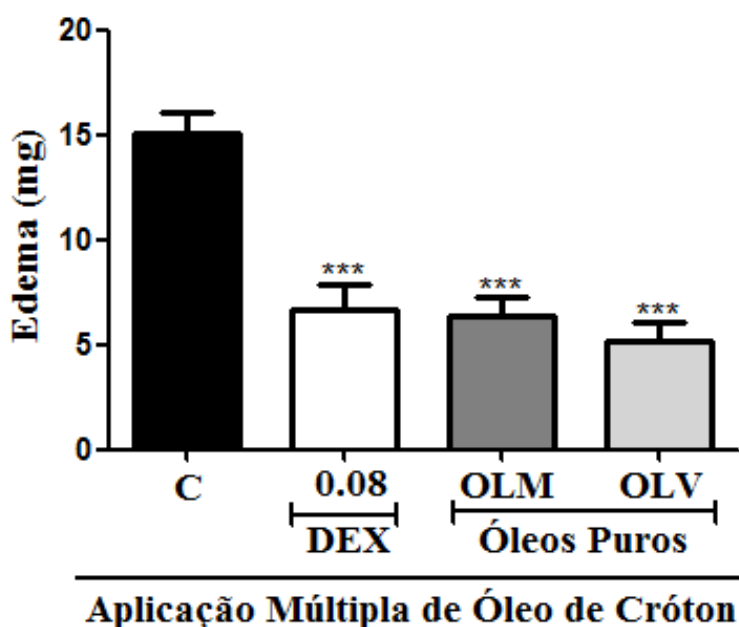


Figura 8 – Efeito do OLM ou OLV, administrados por via tópica, no edema de orelha crônico induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos. A aplicação de óleo de cróton foi realizada em dias alternados, durante 9 dias. A partir do 5º dia do experimento, a orelha direita dos animais recebeu acetona (C), dexametasona 0,08 mg/orelha (DEX), OLM ou OLV (Puros) 2 vezes ao dia. Os gráficos representam a média do edema de orelha (%) e as barras verticais o E.P.M de 8 animais registrados após 9 dias da primeira aplicação tópica do óleo de cróton. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e Teste de Student- Newman- Keuls).

Tabela 13 – Efeito do OLM e OLV sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.

Grupo	Dose (mg/mL)	Edema (mg)	Inibição (%)
Controle Negativo	–	15,0 ± 0,96	–
Dexametasona	8	6,6 ± 1,17***	56%
OLM	Puro	6,3 ± 0,89***	58%
OLV	Puro	5,1 ± 0,94***	66%

Valores expressos em média ± E.P.M. (*** $p < 0,001$ vs controle); (ANOVA e Teste de Student-Newman-Keuls).

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). Conforme descrito anteriormente, os ésteres de forbol presentes no OC são conhecidos por promoverem uma rápida e intensa resposta inflamatória que é desencadeada principalmente pela ativação da PKC, que por sua vez ativa diversas vias, gerando aumento da permeabilidade vascular, liberação de AA e consequente síntese de seus metabólitos como PGs e LTs e ao aumento da expressão moléculas como COX, IL-1, TNF- α e moléculas de adesão (BRALLEY et al., 2007; GARBOR, 2000).

Assim, a aplicação repetida do OC promove a instalação de uma resposta inflamatória persistente que é caracterizada pelo aumento no peso das orelhas, intensa infiltração celular, mas principalmente por uma hiperproliferação epidérmica (aumento na espessura da epiderme com desenvolvimento de acantose), parâmetros similares aos que ocorrem em algumas doenças inflamatórias crônicas de pele como a psoríase (STANLEY et al., 1991; LEE et al., 2009). Corticoesteroides e inibidores da LOX demonstram atividade nesse modelo, enquanto que os inibidores da COX e anti-histamínicos demonstram pouco ou nenhum efeito (GREEN & SHUSTER, 1987). Por isso, esse modelo demonstra ação de fármacos que influenciam a liberação de leucotrienos (STANLEY et al., 1991).

Durante o experimento crônico, foi observado que tanto o OLM como o OLV foram capazes de promover uma diminuição da espessura das orelhas após 120 horas do início do tratamento, reduzindo o percentual de edema consideravelmente no último dia do experimento (Figura 11, p. 64 e Figura 12, p. 65). A atividade antiinflamatória de produtos naturais obtidos de animais tem sido evidenciada em outros estudos (FERREIRA et al., 2010). Yoganathan et al., (2003) avaliaram a atividade antiinflamatória do óleo de *Dromaius novaehollandiae* em modelos de inflamação de camundongos usando óleo de cróton como agente flogístico. O percentual de inibição do edema em camundongos tratados com o óleo de *Dromaius novaehollandiae* foi de 70%. Falodun et al., (2008) observaram a eficácia da gordura de *Boa constrictor* frente a inflamações de pele, cujas três concentrações da gordura apresentou um percentual de inflamação do edema de 65% (12 mg/orelha), 42% (6 mg/orelha) e 63% (3 mg/orelha).

Eventualmente, o mecanismo de ação envolvido neste processo pode ser explicado pelo envolvimento de enzimas LOX. Nas doenças crônicas, como artrite reumatóide e psoríase, há uma alteração na liberação de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, interleucinas), fatores de crescimento e enzimas pró-inflamatórias como COX

e LOX que geram PGs e LTs, respectivamente, resultantes da infiltração de leucócitos no tecido cutâneo (células T, neutrófilos e mastócitos) (KRUEGER & BAWCOCK, 2006).

Os ácidos graxos identificados nas espécies estudadas são referenciados na literatura como possuindo efeito significativo nos eventos relacionados a processos inflamatórios. O ácido linoleico aplicado topicamente possui grande capacidade de ser absorvido pelo estrato córneo, podendo em cinco dias restaurar a pele humana com vários distúrbios dermatológicos (LOWE & STOUGHTON, 1977).

Ferreira et al. (2010) demonstraram a atividade antiinflamatória tópica do óleo do lagarto *Tupinambis merianae* (OTM) utilizando modelos de edema de orelha induzido pela aplicação tópica de diversos agentes flogísticos (óleo de cróton, fenol, capsaicina, ácido araquidônico). Neste estudo os autores atribuem à atividade antiinflamatória encontrada, ao ácido linoleico presente no OTM por este atuar como precursor do ácido 13-hidroxi-octadecaenoico (13-HODE) pela via da 15-LOX, uma substância que inibe a produção de superóxidos, reduzindo a migração de leucócitos PMN através do endotélio que é ativado por citocinas, promotores da vasodilatação da aorta, e modulando a ação de leucotrienos e prostanoídes. A partir do conhecimento dos ácidos graxos presentes no OLM e OLV (Tabela 9, p. 62), sugerimos que o ácido linoleico, um dos componentes majoritários em ambos os óleos, pode estar envolvido na diminuição do edema causado pela inflamação tópica.

CONCLUSÃO

1. Tanto no OLM como no OLV foram identificados ésteres metílicos de ácidos graxos em proporções variadas. A maioria dos ésteres presentes no OLM é da classe dos insaturados, enquanto que no OLV foi observada predominância de compostos da classe dos saturados;
2. Os óleos de *L. macrosternum* e *L. vastus* quando testados isoladamente não demonstraram inibição significativa do crescimento bacteriano e fungico frente a maior parte das cepas testadas, exceto para as linhagens *P. aeruginosa* ATCC 15442 e *C. krusei* ATCC 6258, respectivamente;
3. Quando em associação com os aminoglicosídeos e antifúngicos os óleos de *L. macrosternum* e *L. vastus* não alteraram a atividade antibiótica dos mesmos frente a todas as linhagens de microorganismos testados;
4. A aplicação tópica do OLM e OLV puros demonstrou eficácia na redução do edema induzido pelo óleo de cróton (aplicação múltipla). Possivelmente essas ações estão relacionadas com a presença de ésteres de ácidos graxos insaturados nos dois óleos com atividade antiedematogênica já descrita na literatura.

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 HSU, M.J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 38, p. 739-742, 2007.
- ALBUQUERQUE UP; ANDRADE LHC. Conhecimento botânico tradicional e conservação em uma área de caatinga no estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, vol. 16, n. 3, p. 273-285, 2002.
- ALBUQUERQUE, U.P.; MONTEIRO, J.M.; RAMOS, M.A.; AMORIM, E.L.C. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 110, n.1, p. 76-91, 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**, vol. 47, n. 5, p. 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**, vol. 13, n. 4, p. 282-284, 1990.
- ALLABY, M. 2010. Animals: from mythology to zoology. New York. **Facts On File**, Inc.
- ALMEIDA, A.V. Prescrições zoterápicas indígenas brasileiras na obra de Guilherme Piso (1611-1679). In: ALVES, A.G.C., LUCENA, R.F.P., ALBUQUERQUE, U.P. (Eds.), **Atualidades em Etnobiologia e Etnoecologia**. Sociedade Brasileira de Etnobiologia e Etnoecologia, Nuppea, PP. 47-60, 2005.

ALMEIDA, C.F.C.B.R.; ALBUQUERQUE, U.P. Uso de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): Um estudo de caso. **Interciência**, vol. 27, 2002.

ALVARO, M.S.; ROBINSON, J.G.; REDFORD, K.H.; KAPLAN, H. The Sustainability of Subsistence hunting in the Neotropics. **Conservation Biology**, vol. 11, p. 977-982, 1997.

ALVES, R.R.N. Fauna used in popular medicine in Northeast Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 5, p.1, 2009.

ALVES, R.R.N., ROSA, I.L. Zootherapy goes to town: the use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 113, p. 541-555, 2007a.

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**, vol. 7, p. 9, 2011.

ALVES, R.R.N.; BARBOSA, J.A.A.; SANTOS, S.L.D.X.; SOUTO, W.M.S.; BARBOZA, R.R.D. Animal-based Remedies as Complementary Medicines in the Semi-arid Region of Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2011, n. 2011, p.1–15, 2011.

ALVES, R.R.N.; MENDONÇA, L.E.T.; CONFESSOR, M.V.A.; VIEIRA, W.L.S.; LOPEZ, L.C.S. Hunting strategies used in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 5, p. 1-50, 2009.

ALVES, R.R.N.; NETO, N.A.L.; BROOKS, S.E.; ALBUQUERQUE, U.P. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 124, n. 3, p. 600-608, 2009.

ALVES, R.R.N.; ROSA, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 1, p. 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**, vol. 107, p. 259-276, 2006.

ALVES, R.R.N.; ROSA, I.L. Zootherapeutic practices among fishing communities in North and Northeast Brazil: a comparison. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 111, p. 82–103, 2007b.

ALVES, R.R.N.; SOUTO, W.M.S.: Etnozoologia: conceitos, considerações históricas e importância. In: **Etnozoologia no Brasil: Importância, Status Atual e Perspectivas**. Volume 7, 1ª Ed. Editado por ALVES, R.R.N.; SOUTO, W.M.S.; MOURÃO, J.S.; Recife, PE, Brazil: NUPEEA; 2010: 20-40.

ALVES, R.R.N.; SOUTO, W.M.S.; BARBOZA, R.R.D. Primates in traditional folk medicine: a world overview. **Mammal Review**, vol. 40, p. 155-180, 2010.

ALVES, R.R.N.; SOUTO, W.M.S.; Ethnozoology in Brazil: current status and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 7, p. 1-22, 2011.

ALVES, RRN; MENDONÇA, LET; CONFESSOR, MVA; VIEIRA, WLS; LOPEZ, LCS. Hunting strategies used in the semi-arid region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 5, p.1-12, 2009.

ANDRADE, E.B.; LIMA-JUNIOR, T.B.; LEITE-JUNIOR, J.M.A.; LEITE, J.R.S.A. Predation by native fish and feeding by crab species on *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro, 1926 (Anura: Leptodactylidae) in northeastern, Brazil. **Herpetology Notes**, vol. 5, p. 173-175, 2012.

ANDRADE, J. N.; COSTA-NETO, E.M.O. comércio de produtos zoterápicos na cidade de Feira de Santana, Bahia, Brasil. **Sitientibus**, vol. 6, p. 37-43, 2006.

ANDRADE, L.A.; PEREIRA, I.M.; LEITE, U.T.; BARBOSA, M.R. Análise da cobertura de duas fitofisionomias de caatinga, com diferentes históricos de uso, no município de São João do Cariri, Estado da Paraíba. **Cerne**, vol. 11, n.3, p. 253-262, 2005.

ANGELIOTTI, F.; SÁ, I.B.; MENEZES, E.A.; PELLEGRINO, G.Q. Mudanças climáticas e desertificação no semiárido brasileiro. Petrolina-PE. **Embrapa semiárido**. 2009. 295p.

ANYINAM, C. Ecology and ethnomedicine: exploring links between current enviromental crisis and indigenous medicinal practices, **Social Science & Medicine**, vol. 40, n. 3, p. 321-329. 1995.

ARAÚJO, J.M. 1977. Medicina rústica. São Paulo, **Companhia Editora Nacional**.

ARRIGHI, R. B. G.; NAKAMURA, C.; MIYAKE, J.; HURD, H.; BURGESS, J. G. Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malarías. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 46, p. 2104-2110, 2002.

ARTUSO, A. Bioprospecting, benefit sharing, and biotechnological capacity building. **World Development**, vol. 30, p. 1355-1368. 2002.

ASHWELL, J.D.; LU, F.W.; VACCHIO, M.S. Glucocorticoids in T cell development and function. **Annual Review of Immunology**, vol. 169, p. 309-245, 2000.

AURICCHIO, P.; SALOMÃO, M. G. (Orgs.). Técnicas de coleta e preparação de vertebrados para fins científicos e didáticos. **Instituto Pau Brasil de História Natural**, São Paulo, p. 350, 2002.

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

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

BALAT, M.B. A critical review of bio-diesel as a vehicular fuel. **Energy Conversion and Management**, vol. 49, p. 2727-2741, 2008.

BARBOSA, J.A.L.; NOBREGA, V.A.; ALVES, R.R.N. Hunting practices in the semiarid region of Brazil. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, vol. 10, n. 3, p. 486-490, 2011.

BARROS, C.M.; ANDRADE, L.R.; ALLODI, S.; VISKOV, C.; MOURIER, P.A.; CAVALCANTE, M.C.; STRAUS, A.H.; TAKAHASHI, H.K.; POMIN, V.H.; CARVALHO, V.F.; MARTINS, M.A.; PAVÃO, M.S. The Hemolymph of the Ascidian *Styela plicata* (Chordata-Tunicata) Contains Heparin inside Basophil-like Cells and a Unique Sulfated Galactoglycan in the Plasma. **Journal Biological Chemistry**, vol. 282, p. 1615-1626, 2007.

BAZZANO, F.C.O. Aspectos Éticos da Pesquisa Científica, In: SILVA, José Vitor da (Org.) et al., **Bioética: meio ambiente, saúde e pesquisa**. São Paulo: Iátria. 149-180, 2006.

BEATTIE, A.J. New Products and Industries from Biodiversity. In: **Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends**. Coordinating: HASSAN, R., SCHOLLES, R. and ASH, N. vol. 1, 2005.

BEGOSSI, A.; SILVANO, R.A.M.; AMARAL, B.D.; OYAKAMA, O.T. Use of Fish and game by inhabitants of na Extrative Reserve (Upper juruá, Acre, Brazil). **Environment, Development and Sustainability**, vol. 1, p. 128-139, 2009.

BITTENCOURT, R.M. **Extração de ácidos graxos da semente do Tucumã Açú (*Astrocaryum macrocarpum* Huber)**. Belém, 2009. 49 p. Monografia (Curso de Licenciatura em Química). Departamento de Química. Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil.

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

BOCKISCH, M. Fats and oil handbook. Champaign, Aocs, 1993. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Manole, 2006.

BORGES-LEITE, M. J. **Estudo da herpetofauna do município de São Gonçalo do Amarante, litoral oeste do Ceará**. Fortaleza, 2008. 53 p. Monografia (Curso de Ciências Biológicas). Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

BOSCH, T.C.G.; AUGUSTIN, R.; ANTON-ERXLEBEN, F.; FRAUNE, S.; HEMMRICH, G.; ZILL, H.; ROSENSTIEL, P.; JACOBS, G.; SCHREIBER, S.; LEIPPE, M.; STANISAK, M.; GRÖTZINGER, J.; JUNG, S.; PODSCHUN, R.; BARTELS, J.; HARDER, J.; SCHRÖDER, J.M. Uncovering the evolutionary history of innate immunity: The simple metazoan *Hydra* uses epithelial cells for host defence. **Developmental and Comparative Immunology**, vol. 33, p. 559-569, 2009.

BOUCLIER, M.; CAVEY, D.; KAIL, N.; HENSBY, C. Experimental models in skin pharmacology. **Pharmacological Reviews**, vol. 42, p. 127-154, 1990.

BRALLEY, E.E.; HARGROVE, J.L.; GREENSPAN, P.; HARTLE, D.K. Topical anti-inflammatory activities of *Vitis rotundifolia* (muscadine grape) extracts in the tetradecanoylphorbol acetate model of ear inflammation. **Journal of Medicinal Food**, vol. 10, p. 636-642, 2007.

BRAND, G.D.; KRAUSE, F.C.; SILVA, L.P.; LEITE, J.R.S.A.; MELO, J.A.T.; PRATES, M.V. PESQUERO, J.B.; SANTOS, E.L.; NAKAIE, C.R.; COSTA-NETO, C.M.; BLOCH JR, C. Bradykinin-related peptides from *Phyllomedusa hypochondrialis*. **Peptides**, v. 27, p. 2137-46. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. GMEFH/GGMED. Prêmio Inovação na Gestão Pública Federal, de 28 de setembro de 2009. **Medicamentos fitoterápicos: Parte I – Registro e políticas Brasília, 2007**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/medicamentos_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 28.Set. 2012.

BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional do Semi Árido, 2007. Disponível em: < <http://www.insa.gov.br/index.php/content/view/97.html>> Acesso em:27/09/2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade da caatinga: áreas e ações prioritárias para a B615 conservação/organizadores: José Maria Cardoso da Silva, Marcelo Tabarelli, Mônica Tavares da Fonseca, Livia Vanucci Lins – Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente: Universidade Federal de Pernambuco, 382 p., 2003a.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169&id_pagina=1> Acesso em: 08/07/2011.

BROWN, K.L.; HANCOCK, R.E.W. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. **Current Opinion in Immunology**, vol. 18, p. 24-30, 2006.

BRUNETON, J. In: Pharmacognosy, Phytochemistry and Medicinal Plants. **Intercept Ltd.**, London, England, p. 111 – 144, 1995.

CALDER, P.C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 4, p. 433-446, 2003.

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**, vol. 4, p. 18, 2008.

CAMPOS, M.D. Fazer o tempo e o tempo do fazer: ritmos em concorrência entre o ser humano e a natureza. **Ciência e ambiente**, vol. 8, p. 7-33, 1994.

CARDOSO, (1998–2001) Telma Abdalla de Oliveira. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletim Central**. Panamaense Fiebre Aftosa, vol. 64, n. 67, p. 3-17.

CARDOSO, C.R.; SOUZA, M.A.; FERRO, E.A.; FAVORETO, S.J.R.; PENA, J.D. Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty Acids on the healing of cutaneous wounds. **Wound Repair and Regeneration**, vol. 12, n. 2, p. 235-243, 2004.

CARVALHO, C.O. **Comparação entre métodos de extração do óleo de *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae - buriti) para o uso sustentável na reserva de desenvolvimento Tupé: rendimento e atividade antimicrobiana**. Manaus, 2011. 110 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Departamento de Botânica, Universidade do Estado do Amazonas, Amazonas, Brasil.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, **Tecmedd**, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; CASCON, V.; POSSEBON, L.S.; MORIMOTO, M.S.S.; CARDOSO, L.G.V.; KAPLAN, M.A.C.; GILBERT, G. Topical antiinflammatory and analgesic activities of *Copaifera duckei* Dwyer. **Phytotherapy Research**, vol. 19, p. 946-950, 2005.

CARVALHO, P.D.; CAMPOS, P.R.B.; NOFFS, M.D.; OLIVEIRA, J.G.; SHIMIZU, M.T.; SILVA, D.M. Application of microbial lipases to concentrate polyunsaturated fatty acids, **Química Nova**, vol. 26, n.1, p. 75-80, 2003.

CELISO, R. Criação de condições e incentivos para a conservação local da biodiversidade. In: SPETH, J.C; HOLDGATE, M.W; Tolba, M.K. (Eds). **A estratégia global da biodiversidade. Diretrizes de ação para estudar, salvar e usar de maneira sustentável e justa a riqueza biótica da Terra**. Rio de Janeiro, WRI/UICN/PNUMA, p. 92-93, 1992.

CHEN, Y.; XU, X.; HONG, S.; CHEN, J.; LIU, N.; UNDERHILL, C. B.; CRESWELL, K.; ZHANG, L. RGD-tachyplesin inhibits tumor growth. **Cancer Research**, vol. 61, p. 2434-2438, 2001.

CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, vol. 24, p. 91-95, 2003.

CLÉMENT, D. The historical foundations of ethnobiology (1860-1899). **Journal of ethnobiology**, vol. 18, p. 161-161, 1998.

CONLON, J.M. A proposed nomenclature for antimicrobial peptides from frogs of the genus *Leptodactylus*. **Peptides**, vol. 29, p. 1631–1632, 2008.

CONLON, J.M.; AL-GHAFFER, N.; ABRAHAM, B.; SONNEVEND, A.; KING, J.D.; NIELSEN, P.F. Purification and properties of laticaptin, an antimicrobial peptide from skin secretions of the South American frog *Leptodactylus laticeps*. **Protein & Peptide Letters**, vol. 13, p. 411–415, 2006.

CONN, E.E.; STUMPF, P.K. Introdução à bioquímica. 4. ed. São Paulo: **E. Blucher**, 1980.

CORREIA, I.M.S. **Extração e pirólise do óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) visando a produção de biocombustíveis**. Natal, 2009. 105 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, Brasil.

COSTA-NETO, E. M. Barata é um santo remédio: Introdução à zooterapia popular no Estado da Bahia. Universidade Estadual de Feira de Santana, Brasil, 103 p., 1999.

COSTA-NETO, E.M.; ALVES, R.R.N.; Estado da arte da zooterapia popular no Brasil. In: **Zooterapia: os animais na medicina popular brasileira**. V.2, Editado por: COSTA-NETO, E.M.; ALVES, R.R.N. Recife, PE, Brasil: Nuppea; 2010: 15-54.

COTRAN, R.; KUMAR, V.; COLLINS, T. ROBBINS. Patologia Estrutural e Funcional. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2006.

COUTINHO, H.D.M. 2010. Validação de atividades biológicas e isolamento de produtos naturais de origem animal. In: Costa-Neto, E, Alves, R.R.N. **Zooterapia:os animais na medicina popular brasileira**. Nupeea. 2010.

DANTAS, M. A. T; DONATO, C.R. 2009. Ocorrência de *Leptodactylus vastus* Lutz, 1930 (Amphibia - Anura: Leptodactylidae) na Caverna Toca da Raposa, Simão Dias, Sergipe. **Anais do XXX Congresso Brasileiro de Espeleologia**. Montes Claros MG, Sociedade Brasileira de Espeleologia.

DE BERNARDIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M.; ARNICO-ROXAS, M. Protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rat paw edema. **Agents Actions**, vol. 42, n. 1-2, p. 29-33, 1994.

DE LA RIVA, I.; MALDONADO, M. First record of *Leptodactylus ocellatus* (linnaeus, 1758) (Amphibia, Anura, Leptodactylidae) in Bolivia and comments on related species. **Graellsia**, vol. 55, p. 193-197, 1999.

DIXON, J.R.; & STATON, M.A. Some aspects of the biology of *Leptodactylus macrosternum* Miranda-Ribeiro (Anura: leptodactylidae) of the Venezuelan Llanos. **Herpetologica**, p. 227-232, 1976.

DOURADO, F.S.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; MELO, J.A.T.; BLOCH JR, C.; SCHWARTZ, E.F. Antimicrobial peptide from the skin secretion of the frog *Leptodactylus syphax*. **Toxicon**, vol. 50, p. 572-80, 2007.

DRUMOND, MA; KIILL, LHP; LIMA, PCF; OLIVEIRA, MC; OLIVEIRA, VR; ALBUQUERQUE, AG; NASCIMENTO, CES; CAVALCANTI, J. Avaliação e identificação de áreas prioritárias para conservação e utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga- Estratégias para o Uso Sustentável da Biodiversidade da Caatinga - **Documento para discussão no GT Estratégias para o Uso Sustentável**, Petrolina, 2000.

DRUMOND, M.A.; SCHISTEK, H.; SEIFFARTH, J.A. Caatinga: um bioma exclusivamente brasileiro... e o mais frágil. **Revista do Instituto Humanista Unisinos**, n. 389, Ano XII, 2012.

ELLEN, R. 1997. Indigenous knowledge of the rainforest: perception, extraction and conservation. <http://www.ulb.ac.be/soco/apft/GENERAL/PUBLICAT/ARTICLES/Ellen2.htm> (acesso em 25 Ago. 2012).

FALKENBERG, M.B.; PEREIRA, P.A. Epibatidina: uma breve revisão. **Latin American Journal of Pharmacy**, vol. 24, n. 4, p. 614-618, 2007.

FALODUN, A.; OWOLABI, O.J.; OSAHON, O. Physicochemical, antimicrobial and anti-inflammatory evaluation of fixed oil from *Boa constrictor*. **Acta Polonae Pharmaceutica – Drug Research**, vol. 65, p. 477-480, 2008.

FAVACHO, H.A.S. **Caracterização fitoquímica e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do óleo fixo de *Euterpe oleracea* mart.** BELÉM, 2009. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil.

FERNANDEZ-LOPEZ, S.; KIM, H. S.; CHOI, E. C.; DELGADO, M.; GRANJA, J. R.; KHASANOV, A.; KRAEHEBUEHL, K.; LONG, G.; WEINBERGER, D. A.; WILCOXEN, K. M.; GHADIRI, M. R. Antibacterial agents based on the cyclic D,L-alpha-peptide architecture. **Nature**, vol. 412, p. 452-455, 2001.

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**, vol. 2012, n. 2012, p. 1-20, 2012.

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 merianae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 514-520, 2010.

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**, vol. 126, n. 2, p. 233-237, 2009b.

FERREIRA, F.S; BRITO, S.V; RIBEIRO, S.C; SARAIVA, A.A.F; ALMEIDA, W.O; ALVES, R.R.N. Animal-based folk remedies sold in public markets in Crato and Juazeiro do Norte, Ceará, Brazil. **B.M.C Complementary and Alternative medicine**. vol. 9, p. 17, 2009a.

FLEMINING-MORAN, M. The folk view of natural causation and disease in Brazil and its relation to traditional curing practices. **Boletim do Museu Paraense Emílio Göeldi**, vol. 8, n. 1, p. 65-156, 1992.

FRANGOIANNIS, N. G.; SMITH, C. W.; ENTMAN, M. L. The inflammatory response in myocardial infarction. **Cardiovascular Research**, vol. 53, p. 31-47, 2002.

FREITAS, M.A. & SILVA, T.F.S. 2007. Guia ilustrado: a herpetofauna das caatingas a áreas de altitude do Nordeste brasileiro. **Pelotas: USEB**, 384p.

FROST DARREL, R. 2011. Amphibian species of the World: an Online Reference. Version 5.5 (31 January, 2011). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/American Museum of Natural History, New York, USA>.

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

GARG, R.; RAMCHANDANI, A.G.; MARU, G.B. Curcumin decreases 12- O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, vol. 29, p. 1249-1257, 2008.

GEANKOPLIS, C.J. Transport processes and separations process principles. 4th ed. New Jersey: **Prentice Hall**, 2003.

GERIS, R.; SANTOS, N.A.C.; AMARAL, B.A.; MAIA, I.S.; CASTRO, V.D.; CARVALHO, J.R.M. Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química. **Química Nova**, vol. 30, n. 5, p. 1369-1373, 2007.

GOLDBERG, S. R.; BURSEY, C. R.; TRUJILLO, J. D.; KAISER, H. Intestinal helminths of seven frog species from Trinidad and Tobago. **Caribbean Journal of Science**, vol. 38, p. 147–159, 2002.

GOMES, V.M.; CARVALHO, A.O.; DA CUNHA, M.; KELLER, M.N.; BLOCH JR., C.; P. DEOLINDO, P.; ALVES, E.W. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, vol. 45, p. 817–827, 2005.

GORENSTEIN, M.R. **Diversidade de espécies em comunidades arbóreas: aplicação de índices de distinção taxonômica em três formações florestais do estado de São Paulo**. Piracicaba, 2009. 146 p. Tese (Doutorado em Recursos Florestais). Departamento de Ciências Florestais. Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

GOUVEIA, S.F.; ROCHA, P. A.; MIKALAUSKAS, J.S.; SILVEIRA, V.V. *Rhinella jimi* (Cururu toad) and *Leptodactylus vastus* (Northeastern pepper frog). Predation on bats. **Herpetological Review**, vol. 40, p. 210-210, 2009.

GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Critical Care Clinics**, vol. 24, n. 2, p. 421–442, 2008.

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

GUEDES, A.M.M. **Estudo da extração de óleo da polpa de tucumãpor CO₂ supercrítico**. Belém, 2006. 78 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Departamento de Engenharia Química e de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Pará, Brasil.

HANCOCK, R.E.W.; SCOTT, M. G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 97, p. 8856-8861, 2000.

HANDERSON, J.; HARRIGTON, J.P.; Ethnozoology of the Tewa Indians. **Buletin 56 Smithsonian Institution, Bureal of American Ethology**, 1914.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, vol. 22, n. 6, p. 475–477, 1973.

HEDQVIST, P.; GAUTAN, N.; LINBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, vol. 161, p. 117-119, 2000.

HEYER, R. 2008. *Leptodactylus vastus*. In: **IUCN 2012**. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **01 August 2012**.

HEYER, R.; LANGONE, J.; LA MARCA, E.; AZEVEDO-RAMOS, C.; DI TADA, I.; BALDO, D.; LAVILLA, E.; SCOTT, N.; AQUINO, L.; HARDY, J. 2010. *Leptodactylus latrans*. In: **IUCN 2012**. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.1. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on **01 August 2012**.

HEYER, W. R. The adaptive ecology of the species groups of the genus *Leptodactylus* (Amphibia, Leptodactylidae). **Evolution**, vol. 23, p. 421–428, 1969.

HEYER, W. R. Variation and taxonomic clarification of the large species of the *Leptodactylus pendactylus* species group (Amphibia: Leptodactylidae) from Middle America, Northern South America, and Amazonia. **Arquivos de Zoologia**, vol. 37, n. 3, p. 269-348, 2005.

HISSA, D.C.; BEZERRA, G.A.; OBRIST, B.; BIRNER-GRÜNBERGER, R.; MELO, V.M.M.; GRUBER, K. Crystallization and preliminary X-ray diffraction of the surfactant protein Lv-ranaspumin from the frog. **Acta Crystallographica**. Section F, vol. 68, p. 321-323, 2012.

HISSA, D.C.; VASCONCELOS, I.M.; CARVALHO, A.F.U.; NOGUEIRA, V.L.R.; CASCON, P.; ANTUNES, A.S.L.; DE MACEDO, G.R.; MELO, V.M.M. Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. **Journal of Experimental Biology**, vol. 211, p. 2707-2711, 2008.

HUNT, B.; VINCENT, A.C.J. Scale and Sustainability of Marine Bioprospecting for Pharmaceuticals. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, vol. 35, n. 2, p. 57-64, 2006.

INSKIP, C.; ZIMMERMANN, A. Human-felid conflict: a review of patterns and priorities worldwide. **Orxy**, vol. 43, n. 1, p. 18-34, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA - IBGE. **Estado e População**. Rio de Janeiro. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 25 janeiro de 2011.

JAVADPOUR, M.M.; JUBAN, M.M.; LO, W.C.; BISHOP, S.M.; ALBERTY, J.B.; COWELL, S.M.; BECKER, C.L.; MCLAUGHLIN, M.L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, vol. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

KIEFFER, A.E.; GOUMON, Y.; RUH, O.; CHASSEROT-GOLAZ, S.; NULLANS, G.; GASNIER, C.; AUNIS, D.; METZ-BOUTIGUE, M.-H. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. **The FASEB Journal**, vol.17, p. 776-778, 2003.

KILL, L. H. P. Caatinga: **Patrimônio brasileiro ameaçado**. Brasil. 2002. Disponível em < www.agronline.com.br > Acesso em 13 de julho de 2012.

KING, J.D.; AL-GHAFFER, N.; ABRAHAM, B.; SONNEVEND, A.; LEPRINCE, J.; NIELSEN, P.F.; CONLON, J.M. Pentadactylin : An antimicrobial peptide from the skin secretions of the South American bullfrog *Leptodactylus pentadactylus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 141, n. 4, p. 393 – 397, 2005.

KING, J.D.; LEPRINCE, J.; VAUDRY, H.; COQUET, L.; JOUENNE, T.; CONLON, J.M. Purification and characterization of antimicrobial peptides from the Caribbean frog, *Leptodactylus validus* (Anura: Leptodactylidae). **Peptides**, vol. 29, p. 1287–92, 2008.

KRUEGER, J.G.; BAWCOCK, A. Psoriasis pathophysiology: current concepts of pathogenesis. **Annual Rheumatic diseases**, vol. 64, p. 30-36, 2006.

LAIRD, s. Bioprospecting: securing a piece of the pie. In: **World Conservation**, July 2007.

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.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. Ecologia e Conservação da Caatinga. Recife: **Editora Universitária da UFPE**, 2003.

LEAL, IR; SILVA, JMC; TABARELLI, M; LACHER JR, TE. Changing the Course of Biodiversity Conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. **Conservation Biology**, vol. 19, p. 701-706, 2005.

LECCI, A.; GIULIANI, S.; TRAMONTANA, M.; CARINI, F.; MAGGI, C. A.; Peripheral actions of thachykinins. **Neuropeptides**, vol. 34, p. 303-313, 2000.

LEE do, Y.; CHOO, B.K.; YOON, T.; CHEON, M.S.; LEE, H.W.; LEE, A.Y.; KIM, H.K. Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 121, p. 28-34, 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de Bioquímica. São Paulo: **Sarvier**, 2000. 839 p.

LEITE, J.M.A.; SILVA, L.P.; SILVA-LEITE, R.R.; FERRARI, A.S.; NORONHA, S.E.; SILVA, H.R.; BLOCH, C.; LEITE, J.R.S.A. *Leptodactylus ocellatus* (Amphibia): mechanism of defense in the skin and molecular phylogenetic relationships. **Journal of experimental zoology Part A Ecological genetics and physiology**, vol. 313, n. 1, p. 1-8, 2010.

LEV, E. Traditional healing with animals (zootherapy) medieval to present-day Levantine practice. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 85, p. 107-118, 2003.

LEY, K. Integration of inflammatory signals by rooling neutrophils. **Immunological Reviews**, vol. 186, p. 8-18, 2002.

LIMA, M.F.; HENRIQUES, C.A.; SANTOS, F.D.; ANDRADE, P.M.M.; DO CARMO, M.G.T. Ácido graxo ômega 3 docosahexaenóico (DHA: C22:6 n-3) e desenvolvimento neonatal: aspectos relacionados a sua essencialidade e suplementação. **Nutrire (São Paulo)**, São Paulo, vol. 28, p. 65-67, 2004.

LIMAVERDE, P.T.; NASCIMENTO, N.R.F.; EVANGELISTA, J.S.A.M.; TOMÉ, A.R.; FONTELES, M.C.; SANTOS, C.F.; CARDI, B.A.; CARVALHO, K.M. Isolation and pharmacological effects of leptoxin, a novel proteic toxin from *Leptodactylus pentadactylus* skin secretion. **Toxicon**, vol. 54, p. 531–538, 2009.

LINDHOLM, P.; GÖRANSSON, U.; JOHANSSON, S.; CLAESON, P.; GULLBO, J.; LARSSON, R.; BOHLIN, L.; BACKLUND, A. Cyclotides: a novel type of cytotoxic agents. **Molecular Cancer Therapeutics**, vol. 1, p. 365-369, 2002.

LOEBMANN, D.; HADDAD, C.F.B. Amphibians and reptiles from a highly diverse area of the Caatinga domain: composition and conservation implications. **Biota Neotropica**, vol. 10, p. 227-255, 2010.

LONE, N.J.; STOUGHTON, R.B. Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. **The British Journal of Dermatology**, vol. 96, p. 155-62, 1977.

LOPES, V.S.; DANTAS, T.N.C.; CUNHA, A.F.; MOURA, E.F.; MACIEL, M.A.M. Obtenção de um tensoativo aniônico a partir de óleo de *Rana catesbeiana* SHAW. **Revista Universidade Rural**. Série Ciências Exatas e da Terra (UFRRJ), vol. 30, n. 2, p. 85 – 97, Jul/Dez, 2010.

MANN, J. Secondary Metabolism, Claredon Press, **Oxford**, 8, 1987.

MASON, O.T. Aboriginal American Zootechny. **Aboriginal American Zootechny**, vol. 1, n. 1, p. 45-81, 1899.

MARKHAN, J.L. A new method for determine the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied Microbiology**, vol. 84, p. 538-544, 1998.

MARQUES, J.G.W. A fauna medicinal dos índios Kuna de San Blas medicinal use of animal products in traditional medicine (Panamá) e a hipótese da universalidade zoterápica [resumo]. **Anais da 46a Reunião Anual da SBPC**, p. 324, 1994.

MARQUES, J.G.W. O Olhar (Des)Multiplicado. O Papel do Interdisciplinar e do Qualitativo na Pesquisa Etnobiológica e Etnoecológica. In: AMOROZO, M.C.L.; MING, L.C.; SILVA, S.P. (ed.). **Métodos de Coleta e Análise de Dados em Etnobiologia, Etnoecologia e Disciplinas Correlatas**. Anais do I Encontro de Etnobiologia e Etnoecologia do Sudeste. São Paulo, S.P: UNESP, 2002.

MARQUES, S.R.; PEIXOTO, C.A.; MESSIAS, J.B.; ALBUQUEQUER, A.R.; SILVA JÚNIOR V.A.; The effects of topical application of sunflower-seed oil on openwound healing in lambs. *Acta Cirurgica Brasileira*, vol. 19, n. 3, p. 196-209, 2004.

MATIAS, E.F.F. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistência bacteriana à aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A. (velame), *Ocimum gratissimum* L. (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC. (erva-baleeira)**. Crato, 2010. 123 p. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular). Departamento de Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Ceará, Brasil.

MAYER, A.M.S.; GUSTAFSON, K.R. Antitumor and Cytotoxic Compounds. **European Journal of Cancer**, vol. 44, p. 2357-2387, 2008.

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

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, vol. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; ROBLES, G.I.L.P.; PILGRIM, J.; FONSECA, G.A.B.; BROOKS, T.; KONSTANT, W.R. (eds.). *Wilderness: earth's last wild places*. **Cemex**, Agrupación Serra Madre, S.C., México. 2002.

MOREIRA, N.X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, vol. 24, p. 105-123, 2002.

MORETTO, E.; FETT, R. Óleos e gorduras vegetais: processamento e análises. 2. ed. rev. **Florianópolis: UFSC**, 1989.

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

MOURA, F.B.P.; MARQUES, J.G.W. Zooterapia popular na Chapada Diamantina: uma medicina incidental? **Ciência & Saúde Coletiva**, vol. 13, p. 2179-2188, 2008.

MOURÃO, J.S.; ARAÚJO, H.F.P.; ALMEIDA, F.S. Ethnotaxonomy of mastofauna as practised by hunters of municipality of Paulista, state of Paraíba-Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 2, n. 19, p. 7, 2006.

MOURÃO, J.S.; NORDI, N. Comparações entre taxonomias Folk e científica para peixes do estuário do Rio mamanguape, Paraíba-Brazil, **Interciência**, vol. 27, n. 12, p. 664-668, 2002.

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

MURPHY, H.S.; WARD, P.A. Inflamação. In: RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. Rubin, Patologia: bases clinicopatológicas da medicina. 4. ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2006.

NABAS, F.; CONTESINI, F.J.; MENIN, S.E.A.; ANTÔNIO, M.A.; BIGHETTI, A. E.; ARAÚJO, C.E.P.; CARVALHO, P.O. Antiedematous effect of oils containig the fatty acids Omega-3 and 6 in mice. **Revista Brasileira de Medicina**, vol. 66, n. 4, p. 92-96, 2009.

NASCIMENTO, A.C.; ZANOTTA, L.C.; KYAW, C.M.; SCHWARTZ, E.N.; SCHWARTZ, C.A.; SEBBEN, A.; SOUSA, M.V.; FONTES, W.; CASTRO, M.S. Ocellatins: new antimicrobial peptides from the skin secretion of the South American frog *Leptodactylus ocellatus* (Anura: Leptodactylidae). **The Protein Journal**, vol. 23, p. 501–508, 2004.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 3.ed., São Paulo: Sarvier, 2002. 975p.

NCCLS – NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.(2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 5ª ed. Villanova, PA: **NCCLS approved standard M7-A5**, 20, 2.

NICKOLOFF, B. J.; NESTLÉ, F. O. Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. **Journal Clinical Investigation**, vol. 13, p. 1664-1675, 2004.

NIELSEN, S.L.; FRIMODT-MØLLER, N.; KRAGELUND, B.B.; HANSEN, P.R. Structure - activity study of the antibacterial peptide fallaxin. **Protein Science**, vol. 16, n. 9, p. 1969-1976, 2007.

NISHIDA, A.K.; NORDI, N.; ALVES, R.R.N. Molluscs production associated to lunar-tide cycle: a case study in Paraíba state under ethnoecology viewpoint. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 2, n. 28, p. 6, 2006.

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, vol. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

O. SHEA, M.; BASSAGANYA-RIERA, J.; MOHEDE, I. C. Immunomodulatory properties of conjugated linoleic acid. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 79, n. 6, p. 1199-1206, 2004.

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

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and unexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PATTERSON, C. E.; LUM, H. Update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. **Endothelium**, vol. 8, p. 75-105, 2001.

PEREIRA, C.S.S. **Avaliação de diferentes tecnologias na extração do Óleo do Pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L)**. Seropédica, 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

POMPÉIA, C. Essencialidade dos Ácidos Graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J., editores. Entendendo a Gordura – Os Ácidos Graxos. São Paulo: Manole, 2002; 27-32.

POMPÉIA, C.; LOPES, L.R.; MIYASAKA, C.K.; PROCÓPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Biological Research**, vol. 33, p. 1255-1268, 2000.

PRADO, C.P.D.A.; UETANABARO, M.; HADDAD, C.F.B. Description of a New Reproductive Mode in *Leptodactylus* (Anura, Leptodactylidae), with a Review of the Reproductive Specialization toward Terrestriality in the Genus. **Copeia**, vol. 2002, n. 4, p. 1128-1133, 2002.

PRANCE, GT. Vegetation. In: WHITMORE, TC; PRANCE, GT (eds.). Biogeography and Quaternary history in tropical America, **Oxford Science Publications**, Oxford, Reino Unido, p. 28-45, 1987.

PRATES, M.V.; SFORÇA, M.L.; REGIS, W.C.B.; LEITE, J.R.S.A.; SILVA, L.P.; PERTINHEZ, T.A.; ARAÚJO, A.L.T.; AZEVEDO, R.B.; SPISNI, A.; BLOCH JR, C. The NMR-derived Solution Structure of a New Cationic Antimicrobial Peptide from the Skin Secretion of the Anuran *Hyla punctata*. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 279, p. 13018–26, 2004.

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

RAGAVAN, S. New paradigms for protection of biodiversity. **Journal of Intellectual Property Rights**, vol. 13, p. 514-522, 2008.

RAHMAN, S.; BHATIA, K.; KHAN, A.Q.; KAUR, M.; AHMAD, F.; RASHID, H.; ATHAR, M.; ISLAM, F.; RAISUDDIN, S. Topically applied vitamin E prevents massive cutaneous inflammatory and oxidative stress responses induced by double application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in mice. **Chemico Biological Interactions**, vol. 172, p. 195-205, 2008.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; ILIC, N.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **Trends in Biotechnology**, vol. 20, p. 522-531, 2002.

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

ROCHA E SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In: International series of Monographs in Pure and Applied Biology. **Modern Trends in Physiological Sciences**, vol. 37, p. 1-47, 2006.

RODRIGUES, E. Plants and animals utilized as medicines in the Jaú National Park (JNP), Brazilian Amazon. **Phytotherapy Research**, vol. 20, p. 378-391, 2006.

RODRIGUES, M.R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 292, p. 869-873, 2002.

ROLLINS-SMITH, L.A.; KING, J.D.; NIELSEN, P.F.; SONNEVEND, A.; CONLON, J.M. An antimicrobial peptide from the skin secretions of the mountain chicken frog *Leptodactylus fallax* (Anura: Leptodactylidae). **Regulatory Peptides**, vol. 124, p. 173–178, 2005.

ROZEK, T.; WEGENER, K.L.; BOWIE, J.H.; OLVER, I.N.; CARVER, J.A.; WALLACE, J.C.; TYLER, M.J. The antibiotic and anticancer active aurein peptides from the Australian Bell Frogs *Litoria aurea* and *Litoria raniformis*. *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, p. 5330-5341, 2000.

RYDBERG, J. Introduction to solvent extraction. Chap. 1. In: RYDBERG, J.; MUSIKAS, C.; CHOPPIN, G.R. Principles and practices of solvent extraction. New York: **Marcel Dekker**, 1992. p. 1-20.

SANT'ANA, P.J.P. É Possível a Bioprospecção no Brasil?. Tese de doutoramento – Universidade Federal do Rio de Janeiro, **Coppe**. Rio de Janeiro, 2002.

SANTANA, G. G.; VIEIRA, W.L.S.; PEREIRA-FILHO, G. A.; DELFIM, F. R.; LIMA, Y.C.C.; VIEIRA, K.S. Herpetofauna em um fragmento de Floresta Atlântica no Estado da Paraíba, região nordeste do Brasil. **Biotemas**, Florianópolis, vol. 21, n. 1, p. 75-84, 2008.

SANTOS JUNIOR, J. C. M. Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. **Revista Brasileira de coloproctologia**, vol. 23, n. 3, p. 206-210, 2003.

SANTOS-FITA, D.; COSTA-NETO, E. M. As interações entre os seres humanos e os animais: a contribuição da etnozootologia. **Biotemas**, vol. 20, n. 4, p. 99-110, 2007.

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.

SATO, Y.; SHIBATA, H.; ARAI, T.; YAMAMOTO, A.; OKIMURA, Y.; ARAKAKI, N.; HIGUTI, T. Variation in synergistic activity by flavone and its related compounds on the increased susceptibility of various strains of methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. **International Journal of Antimicrobial**, vol. 24, p. 28-35, 2004.

SCOTT, P. Bioprospecting as a conservation tool: history and background. Crossing Boundaries in Park Management: Proceedings of the 11th Conference on Research and Resource Management in Parks and on Public Lands, edited by David Harmon. The **George Wright Society**, 2001.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanism of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, vol. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILVA, FBR; RICHÉ, GR; TONNEAU, JP; SOUZA NETO, LTL; BRITO, NC; CORREIA, RC; CAVALCANTI, AC; SILVA, FHBB; SILVA, AB; ARAÚJO FILHO, JC; LEITE, AP. Zoneamento Agroecológico do Nordeste: diagnóstico do quadro natural e agrossocioeconômico. 2 v. **EMBRAPA/CPATSA**, Petrolina; (Convênio EMBRAPA-CPATSA/ORSTOM-CIRAD, Documentos, 80), 1994.

SILVA, J.M.C.; SOUZA, M.A.; BIEBER, A.G.D.; CARLOS, C.J. Aves da Caatinga: Status, uso do habitat e sensibilidade. In: LEAL I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (Ed.). **Ecologia e Conservação da Caatinga**. Recife, Brasil: Ed. Universitária da UFPE, p.237-274, 2003.

SILVA, JMC; TABARELLI, M; FONSECA, MT; LINS, LV. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Parte 1- Fatores Abióticos. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília- DF, 2003.

SILVA, JMC; TABARELLI, M; FONSECA, MT; LINS, LV. Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação. Parte 1- Fatores Abióticos. **Ministério do Meio Ambiente**, Brasília- DF, 2003.

SILVA, L.P.; JOANITTI, G.A.; LEITE, J.R.S.A.; AZEVEDO, R.B. Comparative Study of the Antimicrobial Activities and Mammalian Cytotoxicity of 10 Fatty Acid-Rich Oils and Fats from Animal and Vegetable. **The Natural Products Journal**, vol. 1, n. 1, p. 40-46, 2011.

SINGH, S.P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 2010, p. 200-216, 2010.

SKELDON, A.; SALEH, M. The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, vol. 2, p. 15, 2011.

SMELCEROVIC, A.; VERMA, V.; SPITELLER, M.; AHMAD, S.M.; PURI, S.C.; QAZI, G.N. Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. **Phytochemistry**, vol. 67, p. 171-177, 2006.

SOARES, A.J.S.A. **Legitimação para agir nas ações coletivas em defesa do conhecimento tradicional associado à biodiversidade**. Rio de Janeiro, 2007. 179 p. Dissertação (Mestrado em Direito). Departamento de Direito, Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, Brasil.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Química Orgânica – Vol. 2. Rio de Janeiro: **Editora LTC**, 7ª ed., 366-391, 2002.

SOUSA, J.C.; BERTO, R.F.; GOIS, E.A.; FONTENELE-CARDI, N.C.; HONÓRIO-JÚNIOR, J.E.R.; KONNO, K.; RICHARDSON, M.; ROCHA, M.F.G.; CAMARGO, A.C.M.; PIMENTA, D.C.; CARDI, B.A.; CARVALHO, K.M. Leptoglycin: a new Glycine/Leucine-rich antimicrobial peptide isolated from the skin secretion of the South

American frog *Leptodactylus pentadactylus* (Leptodactylidae). **Toxicon**, vol. 54, p. 23-32, 2009.

SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Colesterol da mesa ao corpo. São Paulo: **Livraria Varela**, 2006. 85p.

STANKEVICINS, L.; AIUB, C.A.F.; MAZZEI, J.L.; LOBO-HAJDU, G.; FELZENSZWALB, I. Cytotoxic, mutagenic and antimutagenic screening of *Arenosclera brasiliensis* acetone and ethanol extracts. **Genetics and Molecular Research**, vol. 7, p. 542-548, 2008.

STANKEVICINS, L.; AIUB, C.A.F.; MAZZEI, J.L.; LOBO-HAJDU, G.; FELZENSZWALB, I. Cytotoxic, mutagenic and antimutagenic screening of *Arenosclera brasiliensis* acetone and ethanol extracts. **Genetics and Molecular Research**, vol. 7, p. 542-548, 2008.

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**, vol. 4, n. 4, 1991.

STEARNS, R.E.C. Ethno-conchology: a study of primitive money. **Ann. Rep. US Nat. Museum for 1887**: 297-334, 1889.

STENHAGEN, E.; ABRAHAMSON, S.; MCLAFFERTY, F. W. Registry of Mass Spectra Data Base. **Washington DC: Government Printing Office**, 1974.

SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. Inflammation and angiotensin II. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 35, p. 881-900, 2003.

TABARELLI, M.; VICENTE, A. Lacunas de conhecimento sobre as plantas lenhosas da caatinga. In: SAMPAIO, E. V. S. B.; GIULIETTI, A. M.; VIRGÍNIO, J.;

GAMARRAROJAS, C. F. L. (Org.). **Vegetação e flora da caatinga**. Recife: APNE/CNIP, 2002.

TAN, P.; LUSCINKAS, F. W.; HONNER-VANNIASINKAM, S. Cellular and molecular mechanisms of inflammation and thrombosis. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, vol. 17, p. 373-389, 1999.

TANDY, D.C. Oilseed extraction. In: WAN, P. J. Introduction to fats and oils technology. **Champaign, Illinois: American il Chemists' Society**, 1991.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**, vol. 88, p. 877-887, 2001.

TOWBIN, H.; PIGNAT, W.; WIESENBERG, I. Time dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema. **Inflammation Research**, vol. 44, p. S160-S161, 1995.

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

VALENZUELA, A.B.; SANHUEZA, J.C.; NIETO, S.K. Acidos grasos Omega-3 de cadena larga em la nutrición humana y animal: um modelo de alimentos funcionales. **Revista Chilena de Nutrição**, vol. 27, p. 345-51, 2000.

VANDEBROEK, I.; THOMAS, E.; SANCA, S.; VAN-DAMME, P.; VAN-PUYVELDE, L.; DE-KIMPE, N. Comparison of health conditions treated with traditional and biomedical health care in a Quechua community in rural Bolivia. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, vol. 4, p. 1, 2008.

VELASCO, P.C. **Impacto da restrição de ácidos graxos essenciais na manutenção das conexões retinotectais de roedores**. Niterói, 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia). Departamento de Neurobiologia, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.

VERLENGIA, R.; GORJAO, R.; KANUNFRE, C.C.; LIMA, T.M.B. Genes Regulated by Arachidonic and Oleic Acid in Raji Cells. **Lipids**, vol. 38, n. 11, p. 1157-1165, 2003.

VIANA, F.A.B., 2003. Guia terapêutico veterinário. **Gráfica e editora CEM Ltda**, Belo Horizonte.

VIANA, S.L. **Avaliação da toxicidade da água residuária da usina de beneficiamento da casca do coco verde em girinos de *Leptodactylus vastus* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae)**. Fortaleza, 2010. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

VIEIRA, W.L.S.; SANTANA, G.G.; VIEIRA, K.S. Description of the tadpole of *Leptodactylus vastus* (Anura: Leptodactylidae). **Zootaxa**, Auckland, vol. 1529, p. 61-68, 2007.

VON IHERING, R. Ensaio geográfico sobre o vocabulário zoológico popular do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**, vol. 3, p. 73-88, 1939.

WANG, K.J.; CAI, J.J.; CAI, L.; QU, H.; YANG, M.; ZHANG, M. Cloning and expression of a hepcidin gene from a marine fish (*Pseudosciaena crocea*) and the antimicrobial activity of its synthetic peptide. **Peptides**, vol. 30, p. 638-646, 2009.

WENNERSTEN, R. Extraction of organic compounds. Chap 9. In: RYDBERG, J.; MUSIKAS, C.; CHOPPIN, G.R. Principles and practices of solvent extraction. **New York: Marcel Dekker**, 1992. p. 115-356.

WILLIAMS, B.J.; ORTIZ-SOLORIO, C.A. MIDDLE AMERICAN FOLK SOIL TAXONOMY*. **Annals of the Association of American Geographers**, vol. 71, n. 3, p. 335-358, 1981.

WILMER, J.L.; BURLESON, F.G.; KAYAMA, F.; KAUNO, J.; LUSTER, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and

its relation to chemical – induced inflammation in mouse skin. **Journal of Investigative Dermatology**, vol. 102, n. 6, p. 915-922, 1994.

YOGANATHAN, S.; NICOLOSI, R.; WILSON, T.; HANDELMAN, G.; SCOLLIN, P.; TAO, R.; BINFORD, P.; ORTHOEFER, F. Antagonism of croton oil inflammation by topical emu oil in CD-1 mice. **Lipids**, vol. 38, p. 603–607, 2003.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, vol. 415, p. 389-395, 2002.

ZHANG, L.; YU, W.; HE, T.; YU, J.; CAFFREY, R.E.; DALMASSO, E.A.; FU, S.; PHAM, T.; MEI, J.; HO, J.J.; ZHANG, W.; LOPEZ, P.; HO, D.D. Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. **Science**, vol. 298, p. 995–1000, 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**, vol. 579, n. 23, pp. 5157-5162, 2005.

ZIBOH, V.A.; MILLER, C.C.; CHO, Y. Metabolism of polyunsaturated fatty acids by skin epidermal enzymes: generation of anti-inflammatory and antiproliferative metabolites. **The American Journal of Clinical Nutrition**, vol. 71, n. 1, p. 361- 366, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE PARECER DO CEUA – URCA



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais

**PARECER DO RELATOR DA CEUA****Processo n° 03/2012**

Título do Projeto de Pesquisa: Estudo químico e avaliação da atividade biológica dos óleos fixos obtidos de duas espécies de rãs da família Leptodactylidae, *Leptodactylus vastus* A. Lutz 1930 e *leptodactylus macrosternum* Miranda-ribeiro, 1926.

Pesquisadores: Waltecio Oliveira Almeida (Pesquisador Orientadora)

Mario Eduardo Santos Cabral (Pesquisador Participante)

FINALIDADE DO PROJETO:

☐ Ensino ☒ Pesquisa

ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:

Título	☒ Adequado	☐ Comentários
Objetivos	☒ Adequados	☐ Comentários
Introdução e Justificativa	☒ Adequadas	☐ Comentários
Cronograma para execução da pesquisa	☒ Adequado	☐ Comentários
Orçamento e fonte financiadora	☒ Adequados	☐ Comentários
Referências Bibliográficas	☒ Adequadas	☐ Comentários

**O PROJETO DESTA PESQUISA ESTA
ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:**

☒ Adequado ☐ Comentários

INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:**Grau de severidade:**

☒ Leve ☒ Moderado ☐ Severo

Justifique:

Este trabalho envolve procedimentos em que os animais experienciam dor, sofrimento ou desconforto moderados, ou dor, sofrimento ou desconforto leves, porém, prolongados.

Espécie: Rattus novegicus

Número Amostral: 180

Redução Amostral:

☐ Sim ☒ Não

Justifique:



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais



Substituição de Metodologia: ☐ Sim ☒ Não
Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: ☒ Sim ☒ Não
Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

A metodologia

Acomodação e manutenção dos animais: ☒ Adequado ☐ Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: ☒ Adequado ☐ Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequado ☐ Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Anestesia dos animais (se aplicável): ☒ Adequado ☐ Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): ☒ Adequado ☐ Inadequado
Se achar inadequado cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Análise e Parecer do relator:

O presente projeto tem como finalidade comprovar o uso popular do óleo fixo proveniente da gordura do *L. vastus* e *L. macrosternum* para o tratamento de infecções e inflamações. O estudo envolvendo produtos naturais de origem animal são escarço na literatura, portanto, o presente projeto apresenta relevância científica. Este projeto abrange também o conhecimento que poderá contribuir para o uso sustentável e para a conservação da espécie. O estado da arte atual presente neste trabalho levantará possibilidades para comprovar a eficácia dos usos popular. A metodologia empregada é pertinente e, segundo o "Expert working group on severity classification of scientific procedures performed on animals" este procedimento é considerado de grau leve a moderado. O experimento será realizado usando 144 a espécie camundongos (*Mus musculus*), com média de peso entre 20-30g e divididos em 18 grupos diferentes. Os animais serão obtidos do biotério da

**UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI**

Comissão de Experimentação e Uso de Animais



Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – CE e mantidos em regime *ab libidum* de água e ração em ciclo claro e escuro de 12/12h. O experimento consiste no tratamento tópico do óleo fixo em diferentes concentrações em uso agudo e crônico segundo metodologia de Gabbor adaptada por Saraiva (2010) e sua influência no perfil anti-inflamatório induzido por diferentes agentes flogísticos. Observamos que o cronograma de execução do projeto é adequado para o alcance dos objetivos propostos.

RECOMENDAÇÃO FINAL:

- ☒ Aprovado
- ☐ Aprovado com recomendações
- ☐ Com Pendência
- ☐ Não aprovado

Crato, 30 de maio de 2012



Assinatura do Relator da CEUA

ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

ARTIGO PUBLICADO

Rodrigues, F.F.G.; Oliveira, L.G.S.; Rodrigues, F.F.G.; Saraiva, M.E.; Almeida, S.C.X.; Cabral, M.E.S.; Campos, A.R.; Costa, J.G.M. **Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves.** Pharmacognosy Research, vol. 4, n. 3, p. 161-165, July-September, 2012.

ARTIGO SUBMETIDO

Cabral, M.E.S.; Dias, D.Q.; Sales, D.L.; Paiva, O.A.; Teles, D.A.; Araujo-Filho, J.A.; Sousa, J.G.G.; Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Kerntopf, M.R.; Alves, R.R.N.; Almeida, W.O. **Evaluations of the antimicrobial activities and chemical compositions of body fat from the amphibians *Leptodactylus macrosternum* (Miranda–Ribeiro, 1926) and *Leptodactylus vastus* (Adolf Lutz, 1930) in northeastern Brazil.** Journal of Ethnopharmacology.