



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 – PPBM
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOPROSPECÇÃO MOLECULAR

MARIANA KÉSSIA ANDRADE ARARUNA

**PERFIL QUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vivo* e *in vitro* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO METANÓLICA DAS FOLHAS DE *Caryocar
coriaceum* WITTM. (PEQUIZEIRO).**

Crato, CE

2012.

MARIANA KÉSSIA ANDRADE ARARUNA

**PERFIL QUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vivo* e *in vitro* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO METANÓLICA DAS FOLHAS DE *Caryocar
coriaceum* WITTM. (PEQUIZEIRO).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri como pré-requisito para obtenção de título de mestre em Bioprospecção Molecular (Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais).

Orientador: Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes

Crato, CE

2012.

MARIANA KÉSSIA ANDRADE ARARUNA

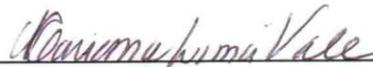
**PERFIL QUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vivo* e *in vitro* DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO METANÓLICA DAS FOLHAS DE *Caryocar
coriaceum* WITTM. (PEQUIZEIRO).**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular. Área de concentração: Bioprospecção Molecular; Linha de pesquisa: Farmacologia de produtos naturais.

Aprovada em 15 de fevereiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA

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



Profa. Dra. Mariana Lima Vale
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf
Universidade Regional do Cariri – URCA

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

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

Dedico este trabalho aos meus pais Derival Faustino Araruna e F^{ca} Edna Andrade da Silva, por toda dedicação a nossa família, mesmo diante de tantas dificuldades nunca mediram esforços para minha educação. Obrigada por serem meus pais. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, criador de tudo, força suprema que rege a vida; “tua palavra é lâmpada para os meus pés e luz para o meu caminho”; sem ti nada posso, nada sou Senhor!

Ao meu noivo, Carlos Alberto Pereira Filho, o amor da minha vida, minha alma gêmea. Obrigada por ser meu porto seguro, apostar em mim, cuidar e estar sempre ao meu lado, seguindo comigo a caminhada da vida. Te amo!

A Ana Laura Dias, Jamile Dias, Rafaella Roque e Pedro Hudson, por estarem sempre presentes em minha vida e serem mais que amigas(o), serem verdadeiras(o) irmãs(o);

Aos meus avós e toda minha família pelo incentivo e amor;

A Maria Dalva Cruz, Carlos Alberto Pereira e Janaína Cruz pelo apoio e carinho; vocês são minha segunda família.

Ao meu pequeno Charle - “o cachorro mais danado e amável do mundo” –.

AGRADECIMENTOS

Aos camundongos, sem esses pequenos seres vivos essa pesquisa não poderia ser realizada;

Ao meu Orientador Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes, pela oportunidade e confiança;

A meu amigo e colaborador Prof. Msc. Rogério de Aquino Saraiva pela parceria e disponibilidade;

Aos colaboradores Prof. Dr. Henrique Douglas de Melo Coutinho, Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa, Prof. Dra. Marta Regina Kerntopf por todo apoio;

As companheiras constantes de experimentos Gerlânia Oliveira e Helenicy Veras e toda a equipe do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular: Alaiane Abreu, Andreza Guedes, Anita Oliveira, Ana Luiza Albuquerque, Damiana Sousa, Daniele Oliveira, Heloísa Helena Souza, Kelly Rodrigues, Laura Leite, Luís Jardelino, Natasha Kênia, Norma Fernandes, Paula Lima, Renata Sampaio, Rúbia Alana Antero, Thales Coutinho, Tharley Alves, Valterlúcio Santos, pelo incentivo, colaboração e amizade;

A Equipe do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, em especial Flaviana Morais e Katiúcia Santos pela colaboração nos testes e amizade;

A Equipe do Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais pelo auxílio e coleguismo;

Aos amigos de Mestrado: Flaviana Morais, Morgana Delfino, Renata Dias, Norma Fernandes, Heloísa Helena Souza, Helenicy Veras, Samara Brito, Teógenes Matias, pelo companheirismo e união em tantas dificuldades enfrentadas;

Aos professores do programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular pelo conhecimento repassado ao longo da trajetória;

As Coordenadoras do mestrado Profa. Dra. Imeuda Peixoto Furtado e Profa. Dra. Sírleis Rodrigues Lacerda; Prof. Dr. Waltécio Almeida e Prof. Dr. Allysson Pinheiro.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular Maria Lenira e Maria Anderciele pela gentileza em nos receber;

A todos os funcionários da URCA, em especial Sylvanna Villar, Fernando Luciano, Seu Gilmar, Seu Raimundo, Seu Luís, Lêda e Frede pela atenção;

A Universidade Regional do Cariri – URCA;

A Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ pelos animais cedidos para pesquisa e a Universidade Federal de Santa Maria – UFSM;

A CAPES e a Funcap pelo suporte financeiro;

A todos que torcem por mim;

Muito Obrigada.

*“A nossa alma espera no Senhor; ele é o nosso
auxílio e o nosso escudo”
(Salmo 33)*

*Sou apenas um caminhante
à procura de si mesmo.*

(Augusto Cury)

SUMÁRIO

LISTA DE SIMBOLOS, SIGLA E ABREVIATURAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1. A pele: bases estruturais.....	25
2.2. Inflamação.....	27
2.3. Resistência bacteriana e a aminoglicosídeos.....	32
2.4. Estresse oxidativo.....	33
2.5. <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm. (Caryocaraceae)	35
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo Geral.....	42
3.2. Objetivos específicos.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. Materiais utilizados.....	44
4.1.1. Material permanente e equipamentos utilizados.....	44
4.1.2. Substâncias, reagentes e soluções.....	45

4.2. Aspectos éticos da pesquisa.....	46
4.3. Material botânico.....	47
4.4. Obtenção do extrato e Fracionamento.....	48
4.5. Prospecção fitoquímica.....	50
4.6. Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por CLAE.....	50
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	51
4.7.1. Microrganismos.....	51
4.7.2. Meios de cultura.....	51
4.7.3. Drogas.....	52
4.7.4. Concentração inibitória mínima (CIM).....	52
4.7.5. Avaliação da atividade modulatória.....	52
4.8. Ensaio de atividade anti-inflamatória tópica.....	53
4.8.1. Animais.....	53
4.8.2. Edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de croton.....	53
4.8.3. Edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de croton.....	53
4.8.4. Edema de orelha induzido por ácido araquidônico.....	54
4.8.5. Edema de orelha induzido por fenol.....	54
4.8.6. Edema de orelha induzido por histamina.....	55
4.8.7. Quantificação do edema e do efeito inibitório médio.....	55
4.9. Avaliação da atividade antioxidante através de seqüestro de radicais livres.....	56
4.10. Análise estatística <i>in vivo</i>	57
5.1. CAPÍTULO I.....	58

Composição química e ação sensibilizante *in vitro* do extrato e fração das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm. na presença de aminoglicosídeos e antifúngicos

5.2. CAPÍTULO II.....	
Atividade anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas de <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm. (Caryocaraceae) em edema de orelha induzido por variados agentes flogísticos	74
6. CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

% por cento; percentual

+ mais

– menos

× vezes, multiplicado por

± mais ou menos

> maior que, superior a

= igual a

< menor que, inferior a

Ø diâmetro

α – alfa

β – beta

μL – microlitro(s)

μm – micrômetro(s)

AA – ácido araquidônico

Abs - absorvância

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

ATCC- *American type culture collection*

°C – graus Celsius

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

C3b – proteína do sistema complemento

CE – Estado do Ceará (Brasil)

CE₅₀ – Concentração eficiente de inibição 50%

CLAE-EM – cromatografia líquida de alta eficiência

CIM – Concentração inibitória mínima

COX – cicloxigenase

COX-1 – cicloxigenase-1

COX-2 – cicloxigenase-2

EHFCC – Extrato hidroalcoólico de *Caryocar coriaceum*

EHFCC-FM - Extrato hidroalcoólico de *Caryocar coriaceum* –Fração metanólica

E.P.M. – erro padrão da média.

DEX – dexametasona

DMSO – dimetilsulfóxido

DPPH - 2,2- difenil-1-picrilhidrazil

EIM – efeito inibitório médio da inflamação

EHFCC - extrato hidroalcoólico das folhas de *Caryocar coriaceum*

EHFCC – FM – extrato hidroalcoólico das folhas de *Caryocar coriaceum* – fração metanólica
et al. – e outros; e colaboradores (latim, abrev. de *et alii*)

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

FMJ – Faculdade de medicina de Juazeiro do Norte - CE

g – grama(s)

h – hora(s)

H₂O – água

IL-1 – interleucina-1

IL-6 – interleucina-6

IND – indometacina

i.p. – via intraperitoneal

kg – quilograma(s)

liso-PAF - lisogliceril-fosforilcolina

LOX – lipoxigenase

5-LOX – 5-lipoxigenase

LFQM – Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (URCA)

LPPN – Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (URCA)

LTB₄ – leucotrieno B₄

LTC₄ – leucotrieno C₄

LTD4 – leucotrieno D4
LTE – leucotrieno E
m – metro(s)
mod – massa do disco retirado da orelha direita
moe – massa do disco retirado da orelha esquerda
mg – miligrama(s)
mg/kg – miligramas de concentração da solução por quilograma de massa corpórea do animal
mg/mL – miligramas de soluto por mililitro de solvente (água destilada ou salina)
min – minuto(s)
mL – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
MPEcont – média do percentual de edema do grupo controle negativo
MPEtrat – média do percentual de edema do grupo tratado
n – número da amostra
NO – óxido nítrico
nm – nanômetro(s)
OC – óleo de croton
P – significância estatística (erro)
PAF – fator de ativação plaquetária
PE – percentual de edema
PGD2 – prostaglandina D2
PGE2 – prostaglandina E2
PGI2 – prostaglandina I2
PKC – proteína quinase C
PLA2 – fosfolipase A2
® - marca registrada
ROS – *reactive oxygen species* (espécie reativa de oxigênio, inglês)

S – *South* (sul)

TPA – 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato

TXA₂ – tromboxano A₂

TNF-α – *tumor necrosis factor – alpha* (fator de necrose tumoral-alfa, inglês)

UECE – Universidade Estadual do Ceará

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

URCA – Universidade Regional do Cariri

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

W – *West* (Oeste)

Wittm. – Wittmack

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema estrutural da pele.....	25
Figura 2. Visão geral das Células e Mediadores envolvidos em uma Resposta Inflamatória Aguda Localizada.....	29
Figura 3. Vias inflamatórias dependentes e independentes do ácido araquidônico (AA). Fonte: Adaptado de ISSA et al., 2006. Designer autora.....	31
Figura 3. Chapada do Araripe: Localização geográfica, entre os limites dos estados de Ceará, Piauí e Pernambuco.....	36
Figura 4. Pequizeiro (<i>Caryocar coriaceum</i>) – árvore. Localizada na Chapada do Araripe, Crato-CE. Março de 2009.....	37
Figura 5. Aspecto geral da folha de <i>C. coriaceum</i> Wittm. (pequi). Parte anterior (esquerda) e posterior (direita).....	38
Figura 6. Exsicata de <i>Caryocar coriaceum</i> Wittm. (pequizeiro).....	47
Figura 7. Etapas de obtenção do extrato das folhas do pequizeiro e fracionamento.....	49

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1. Prospecção fitoquímica: Classes de metabólitos secundários.....	72
Tabela 2. Composição das folhas de <i>Caryocar coriaceum</i>	72
Tabela 3. Avaliação da atividade moduladora do EHFCC bruto.....	73
Tabela 4. Avaliação da atividade moduladora da fração metanólica do pequi (EHFCC-FM).....	73
Tabela 6. Efeito antioxidante de EHFCC e EHFCC-FM em função de radicais livres (DPPH) <i>in vitro</i>	89
Gráfico 1. Perfil cromatográfico de alta eficiência desempenhado por a) EHFCC e b) EHFCC-FM para compostos fenólicos e flavonóides.....	83
Gráfico 2: Efeito tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência de óleo de croton após 6h.....	84
Gráfico 3: Efeito tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência de ácido araquidônico após 1h.....	85
Gráfico 4: Efeito tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência de histamina após 1h.....	86
Gráfico 5: Efeito tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência de histamina após 2h.....	87

Gráfico 6: A) Gráfico referente a espessura das orelhas dos camundongos sobre aplicação múltipla em dias alternados de óleo de croton. B) Percentual médio referente a massa final das orelhas de camundongos, calculada a partir de pesagem em balança analítica.....

RESUMO

PERFIL QUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vivo* e *in vitro* DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRACÇÃO METANÓLICA DAS FOLHAS DE *Caryocar coriaceum* WITTM. (PEQUIZEIRO).

A maioria das plantas de uso na medicina popular não foi estudada quanto a sua composição química, ações farmacológicas. Patologias de pele e resistência microbiana são consideradas problemáticas prevalentes na medicina, além do fato de doenças que acometem a pele se apresentarem de forma bem distinta, com perfis de tratamento e mecanismo variados. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) é uma planta nativa encontrada predominantemente em regiões de cerrado e cerrado da chapada do Araripe (Ceará, Nordeste brasileiro). Suas folhas são ricas em compostos fenólicos, fornecendo substância tintorial e também é empregada na medicina popular no tratamento de gripes, resfriados e distúrbios menstruais. Tendo em vista a viabilidade medicinal da espécie, bem como os escassos relatos na literatura científica a respeito dos efeitos biológicos e propriedades apresentadas pelas folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm, vê-se necessário a investigação fitoquímica, visando ação antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante favorecidas pela planta a nível de extrato hidroalcoólico e fração metanólica (EHFCC e EHFCC-FM). O perfil fitoquímico foi analisado por métodos prospectivos e cromatográficos, onde se identificou como majoritários, os metabólitos rutina (6.81%) e ácido clorogênico (5.68%). Por meio de linhagens bacterianas e fúngicas foi analisado o potencial antimicrobiano de EHFCC e EHFCC-FM, onde determinou-se uma CIM $\geq 1024\mu\text{g/mL}$ para ambos os extratos, no entanto se observou efeito modulatório sinérgico em percentual significativo sob cepas multiresistentes de bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Através do modelo de edema de orelha tópico de fase aguda, induzido por variados agentes flogísticos e crônico induzido por óleo de croton, foi possível diagnosticar o potencial anti-inflamatório e sugerir possíveis mecanismos de ação para o extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas de *C. coriaceum*. Os dados foram avaliados estatisticamente em média \pm erro padrão das médias (E.P.M), numericamente submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de *Student-Newman Keuls*, sendo aceitos como diferenças significativas valores de $p < 0,05$. A avaliação antioxidante se deu pelo método de seqüestro de radicais livres DPPH para concentrações de EHFCC e EHFCC-FM variando entre 6,25 à 50 $\mu\text{g/mL}$ diluído em etanol. Determinou-se a $\text{CE}_{50} = 11,90 \pm 3,883\mu\text{g/mL}$ e $7,65 \pm 1,053 \mu\text{g/mL}$ respectivamente para extrato e fração. De acordo com os resultados apresentados discute-se que os metabólitos secundários presentes na amostra favorecem diretamente para os resultados obtidos, bem como estima-se que a via de ação para a atividade anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato e fração das folhas de *C. coriaceum* se hipotetizem na redução por meio da ação da via lipoxigenase, bem como subsidia referir ainda, estimulação via óxido nítrico ou através de mecanismos antioxidantes (como espécies reativas de oxigênio). Dessa forma conclui-se que EHFCC e EHFCC-FM possuem relevante ação biológica *in vitro* no que se remete às cepas bacterianas avaliadas e radicais livres e *in vivo*, mediante atividade anti-inflamatória tópica. De forma conclusiva, os resultados permitiram inferir um potencial terapêutico tanto no que diz respeito a uma atividade antimicrobiana como anti-inflamatória que requerem estudos futuros mais detalhados para fins de elucidação de hipóteses.

Palavras-chave: *Caryocar coriaceum*, antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana.

ABSTRACT

CHEMICAL PROFILE AND BIOASSAY *in vivo* AND *in vitro* OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT AND METHANOLIC FRACTION OF *Caryocar coriaceum* WITTM (PEQUIZEIRO) LEAVES.

Most plants used in popular medicine has not been studied regarding its chemical composition, pharmacological actions. Skin pathologies and microbial resistance are considered a troublesome prevalent in medicine, besides the fact that skin diseases presents themselves in a distinct form, with varied treatments profiles and mechanisms. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) it's a native plant mainly found in regions of Cerrado(Savahna) of Chapada Do Araripe(Plateau), Ceará Brazil's Northern. Its leaves are rich in phenolic compounds, used in dyeing and also used in popular medicine to treat flu, colds and menstrual disorders. In view of the medical viability of the species as well as the few reports in the scientific literature about the biological effects and to the properties of *Caryocar coriaceum* Wittm leaves, seems necessary a phytochemical research, aiming antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant effects favored by the plant level of hydroalcoholic extract and methanolic fraction (EHFCC and EHFCC-FM). The phytochemical profile was analyzed by prospective and chromatographic methods, where the majority identified were the metabolites rutin (6.81%) and chlorogenic acid (5.68%). By means of fungal and bacterial lines was assessed the antimicrobial potential of EHFCC and EHFCC-FM, was determined a MIC = 1024 µg/mL for both extracts, however a synergistic modulatory effect was observed in a significant percentage of multiresistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacterias. Using the model of acute ear edema induced by various phlogistic and chronic agents induced by croton oil, it was possible to diagnose the anti-inflammatory potential and suggest possible action mechanisms for the hydroalcoholic extract and methanolic fraction of *C. coriaceum* leaves. The data were statistically evaluated on average \pm standard error of mean (SEM), numerically subjected to analysis of variance (ANOVA) and compared using the Student-Newman Keuls, significant differences were accepted as p values <0.05 . The antioxidant evaluation used the method of kidnapping DPPH free radicals for concentrations of EHFCC and EHFCC-FM ranging from 6.25 to 50 µg/mL diluted in ethanol. The determination of the EC₅₀ = 11.90 \pm 3.883 µg/mL and 7.65 \pm 1.053 µg/mL respectively for the extract and fraction. According to the results presented it is argued that the secondary metabolites present in the sample directly to favor the results obtained and it is estimated that the route of action for topical anti-inflammatory activity and antioxidant of the extract and fraction of the leaves of *C. coriaceum* hypothesize reduction through the action of lipoxygenase and subsidizes further noted, stimulation via nitric oxide or antioxidants (like oxygen's reactive species). Thus we conclude that EHFCC and EHFCC-FM and have significant biological activity *in vitro* when it refers to strains of bacteria and free radicals and *in vivo* by topical anti-inflammatory. Conclusively, the result showed a therapeutic potential as regards the anti-microbial and anti-inflammatory activity that require further detailed studies for the elucidation of hypotheses.

Keywords: *Caryocar coriaceum*, antioxidant, anti-inflammatory, anti-microbial.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais para fins terapêuticos é uma prática realizada desde tempos remotos. A crença no poder curativo de certas plantas, bem como substâncias provenientes delas fundamenta-se basicamente no conhecimento tradicional, cultural ou empírico (LULLMANN et al., 2008), simbolizando muitas vezes o único recurso terapêutico de diversas comunidades e grupos étnicos. Em várias regiões do país, desde as mais precárias em recurso financeiro até mesmo nos grandes centros brasileiros, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL, PINTO e VEIGA Jr., 2002).

A maioria dessas plantas de uso na medicina popular não foi estudada quanto a sua composição química, ações farmacológicas e reais indicações terapêuticas comprovada. Estimando também os vegetais que ainda não foram identificados (PEREZ, 2004). As observações populares a respeito do uso e eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, mantendo assim, a prática do consumo de fitoterápicos, validando informações que foram acumuladas durante séculos (MACIEL, PINTO e VEIGA Jr., 2002).

O Brasil é detentor de um terço da flora mundial, considerando-a em extensão e diversificação. A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal em crescente ascendência, tendo 20% da população consumido 63% dos medicamentos alopáticos, apesar de ainda encontrar-se em posição desprivilegiada, não tendo uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos. No contexto, o país é tratado em condições estruturais abaixo de países menos desenvolvidos tecnologicamente, mesmo diante do fato de que há no país um número significativo de pesquisadores que contribuem para o desenvolvimento da química de produtos naturais, a quimiotaxonomia, a farmacologia de produtos naturais e áreas relacionadas (YUNES et al., 2001; FOGLIO 2006).

O aumento no interesse pela pesquisa farmacológica tem como um dos fatores de contribuição a comprovada eficácia de várias substâncias originadas das espécies vegetais (FOGLIO, 2006). Os designados metabólitos secundários, pertencentes a várias classes de compostos quimicamente definidos, são particularmente benéficos quando aplicados a enfermidades diversas, como as de origem imunológica e inflamatória (PAULA JUNIOR,

2004). Diante disso extratos vegetais têm sido pesquisados por apresentarem tais propriedades (BAKKALI et al., 2008), ressaltando a importância da análise científica no sentido de lapidar as substâncias naturais aumentando as propriedades benéficas desejadas, minimizando seus possíveis efeitos tóxicos e/ou adversos (SCHULZ, HANSEL & TYLER, 2002).

Os fitoterápicos constituem preparações formadas por extratos padronizados de uma ou mais plantas que apresentam substâncias ativas em sua composição. Os efeitos farmacológicos observados referem-se a um único constituinte presente ou a interação de vários constituintes químicos do mesmo extrato (WAGNER & WISENAUER, 2006).

Além da busca de produtos que atuem no combate a doenças infecciosas e /ou inflamatórias, e de agentes antibacterianos em virtude do aumento da resistência bacteriana (LU et al., 2007), é dedicada atenção especial àqueles produtos que possam agir como antioxidantes, ou seja, que combatam o estresse oxidativo, coadjuvante na maioria dos distúrbios anteriormente relacionados (PAULA-JÚNIOR, 2004).

O cerrado é o segundo maior tipo de vegetação brasileira em termos de área de ocupação, sendo superado apenas pela Floresta Amazônica (SANO & ALMEIDA 1998), sendo um complexo vegetacional detentor de grande diversidade biológica (RODRIGUES e CARVALHO, 2001). Apresenta-se como a única área de Cerrado preservada no estado do Ceará pela FLONA – Floresta Nacional do Araripe (MMA 1991), e tem como destaque a espécie nativa oleífera *Caryocar coriaceum* WITTM (FIGUEIREDO, et al., 1989).

Pesquisas apontam 107 espécies vegetais, distribuídas em 41 famílias e 85 gêneros no enclave de Cerrado da Chapada do Araripe (COSTA, ARAÚJO E LIMA-VERDE, 2004). Além da abundância de espécimes, a Chapada se destaca em termos de extrativismo de subsistência a favor das comunidades circunvizinhas, que habitam a área entorno da Chapada do Araripe (AUGUSTO E GOES, 2008). Nesse âmbito tem-se como uma das principais fontes rentáveis e de subsistência o extrativismo do pequi. O fruto, pequi, é utilizado como alimento e remédio, (com indicação contra patologias inflamatórias e cicatrizantes) gerando renda e substrato nutricional para as populações de baixo poder aquisitivo, do qual também é extraído óleo a partir de sua polpa para comercialização (MATOS, 2007).

Dessa forma, entende-se de suma importância a realização dessa pesquisa a respeito da espécie *Caryocar coriaceum* Wittm., especialmente em se tratando da sua parte foliar, tendo em vista também os escassos relatos na literatura científica a respeito dos efeitos biológicos e propriedades apresentadas pelas folhas dessa espécie. Tal relato proporcionará a toda a

comunidade científica e principalmente as comunidades que residem em torno da Chapada do Araripe ampliação dos conhecimentos a cerca da espécie vegetal, e principalmente a descoberta de outras propriedades ainda possivelmente desconhecidas da planta, atribuídas ao uso de suas folhas.

Justifica-se ainda a análise biológica da espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. a nível de extrato das folhas, devido ao fato de não haver na literatura relatos tratando de avaliação biológica e química para essa espécie vegetal, sendo este o primeiro relato biológico das folhas da espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. Indícios etnofarmacológicos instigam e favorecem a pesquisa, com o intuito de aprofundar o conhecimento e difundi-lo de forma inédita à academia e sociedade em geral.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A pele: bases estruturais

A pele se divide basicamente em três camadas principais, a epiderme, a derme, e a hipoderme, separadas por uma fina membrana basal. Tais compartimentos são constituídos por vários tipos celulares e estruturas especializadas (STRID et al., 2009), representados pela figura abaixo (figura 1). A estrutura, as propriedades e a composição da pele variam conforme a idade do indivíduo. O sistema tegumentar desempenha variadas funções, como proteção contra lesões físicas, químicas e biológicas, impedir a perda de água, promoção à sensações (dor, pressão, tato e temperatura), sintetizar tipos de hormônios e vitaminas (D), além de promover a regulação térmica, metabolizar xenobióticos e excretar determinadas substâncias por meio das glândulas sudoríparas (CHOUNG et al., 2002; SAMPAIO et al., 2000).

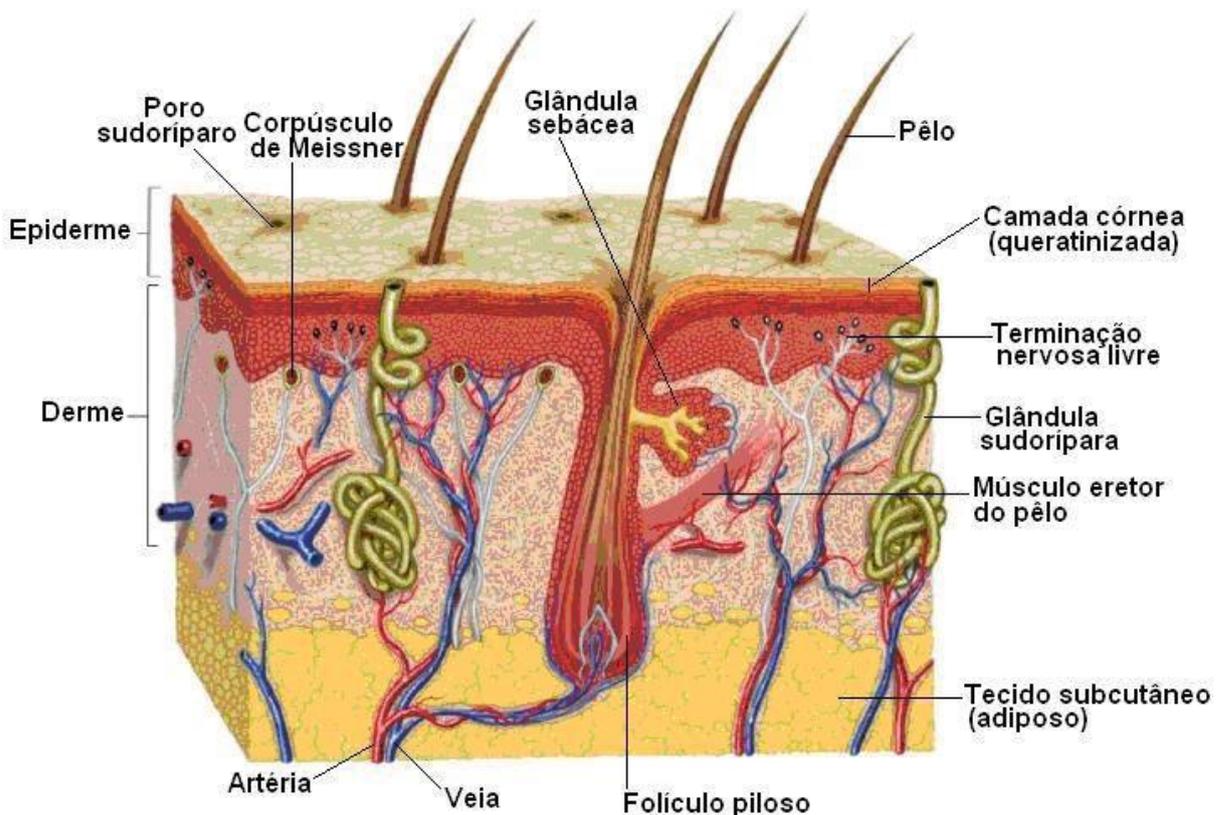


Figura 1: Esquema estrutural da pele.

Fonte: BEAR; CONNORS; PARADISO, 2008.

A interação entre as células epiteliais possibilita o desenvolvimento de variadas funções, desempenhadas pela pele, tornando-a capaz de responder a estímulos nocivos provindos do meio externo; ela é a primeira barreira natural contra organismos invasores (BURBACH et al., 2000).

A camada mais externa da pele, epiderme (SAMPAIO, 2000) de origem ectodérmica, é um epitélio de revestimento estratificado e pavimentoso por conter várias camadas de células que vão se achatando a medida que se tornam mais superficiais (KEDE e SABATOVICH, 2004); Aproximadamente 80/85% da epiderme é constituída por queratinócitos, 10/13% por melanócitos, 4% por células de langerhans e 1% por células de Merckel (KOSTER e ROOP, 2004). A manutenção do número de células nesta camada superior depende do balanço entre a proliferação celular e morte celular dos queratinócitos. Evento esse, governado pela comunicação parácrina e autócrina via hormônios, fatores de crescimento e citocinas ou ainda por intermédio de comunicação intercelular via célula-célula e célula-matrix de adesão ou comunicação intercelular na região da “gap junction” (HAAS e HERLYN, 2005).

Compreende as barreiras: 1) físicas, que consiste principalmente do estrato córneo, junções intercelulares e proteínas do citoesqueleto; 2) químicas e bioquímicas, que compõem a função antimicrobiana através dos lipídios, ácidos, enzimas hidrolíticas, peptídeos antimicrobianos e células fagocíticas; 3) imune-adaptativas, que são constituídas pelos componentes humorais e celulares do sistema imune da pele (PROKSCH et al., 2008). A principal função da epiderme é a produção da queratina, e as células que encontram-se envolvidas nessa função são denominadas queratinócitos (KEDE e SABATOVICH, 2004).

A derme consiste num tecido conectivo, cuja espessura é superior ao da epiderme, porém com uma população celular inferior. De origem mesodérmica, subdivide-se em dois componentes: a porção papilar e a porção reticular (KEDE e SABATOVICH, 2004). Esta estrutura confere à pele elasticidade, força tensil e resistência mecânica (HAAKE et al., 2000). A derme é formada por fibras de colágeno, embora menos compacta que a membrana basal, sendo composta por fibroblastos dérmicos, além de possuir a maior concentração de imunócitos da pele, particularmente visível dentro das áreas perivasculares. Células dendríticas dérmicas, mastócitos, monócitos, macrófagos, células T e células NK também podem estar presentes, bem como uma estrutura linfóide não-organizada que poderia assemelhar-se aos folículos linfóides ou placas de Peyer encontradas no intestino

(SPELLBERG, 2000; STRID et al., 2009). Nesta camada ainda se encontram, glândulas sudoríparas que secretam ácido láctico e ácido úrico, e glândulas sebáceas, que produzem triglicerídeos e ácidos graxos, que são microbicidas (FORTE, 2007). Durante um processo inflamatório ou de cicatrização ocorre o aumento da proliferação e da atividade de fibroblastos em virtude da ação de alguns mediadores pró-inflamatórios como a interleucina 1 α (IL-1 α) e interleucina 1 β (IL-1 β) (FREINKEL e WOODLEY, 2000).

Os vasos sanguíneos presentes na derme permitem que ocorra a infiltração de células migratórias importantes no mecanismo de resposta da defesa inata ou imune e cicatrização, como os macrófagos, linfócitos, eosinófilos, neutrófilos, entre outras (RYAN, 2004). As interações entre os variados tipos celulares presentes nas camadas da pele garantem a esse órgão responder efetivamente a uma gama de estímulos nocivos decorrentes na interface do organismo com o meio externo (BURBACH et al., 2000).

2.2. Inflamação

As doenças dermatológicas têm em sua etiologia componentes inflamatórios e/ou imunológicos, nas quais incluem as dermatites, eczemas e psoríase. Caracterizam-se por alterações cutâneas que conferem um aspecto desagradável à pele, requerendo tratamento prolongado, além de envolver componentes emocionais, os quais promovem recidivas ou exacerbação das lesões (SOARES, 1995). As patologias como dermatites e psoríase afetam vários indivíduos no mundo e a prevalência dessas doenças tem duplicado nos últimos 10 a 15 anos (RUSSELJONES et al., 2005; LJUBOJEVIE et al., 2002). Os mecanismos envolvidos na patogênese das doenças inflamatórias cutâneas podem ser distintos, sendo algumas doenças iniciadas por um processo alérgico ou irritativo. Assim, as doenças inflamatórias cutâneas não envolvem necessariamente o mesmo perfil e, nem conseqüentemente o mesmo tipo de tratamento (FIRESTEIN, 2004; LEUNG et al., 2004).

De forma geral entende-se por inflamação uma resposta de defesa de um tecido vivo vascularizado a um determinado estímulo nocivo, tais como microorganismos, toxinas, células necróticas, entre outros (COTRAN et al., 2000). Esses estímulos desencadeiam uma resposta imediata de proteção, tendo como finalidade erradicar o agente agressor, evitando dessa forma sua disseminação para outras regiões do organismo, promovendo o reparo

tecidual e restabelecendo a homeostasia da pele (FIRESTEIN, 2004). São cinco os sinais clássicos considerados a nível clínico de caracterização da inflamação, representados por calor, eritema, edema, dor e perda de função, dependendo da exacerbação da resposta (RANG et al., 2007). Esses sinais são consequências de eventos vasculares (alteração do fluxo e calibre dos vasos, aumento da permeabilidade ou extravasamento vascular) e celulares (adesão celular, quimiotaxia e ativação leucocitária e fagocitose) (COTRAN et al., 2000).

Quando ocorre um dano tecidual o sistema imunológico aciona também quatro sistemas que produzem mediadores da resposta inflamatória, são: sistema quinina, coagulatório, fibrinolítico e complemento; eles formam uma rede de processos integrados, geradores de diversos mediadores (KUBY et al., 2008). Essas cascatas enzimáticas supracitadas modulam o processo inflamatório responsivo produzindo bradicinina, trombina, plasmina, ativando o sistema complemento, que por sua vez induz a liberação de histamina, por intermédio dos mastócitos e quimiotaxia de neutrófilos, promovendo ativação de mediadores celulares como, serotonina, proteínas dos sistemas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, citocinas, óxido nítrico, componentes lisossômicos dos leucócitos, neuropeptídeos e radicais livres derivados do oxigênio (COTRAN et al., 2000).

Dependendo do período de duração, a inflamação pode ser considerada aguda ou crônica (SILVERTHORN, 2003). A resposta aguda resulta em poucos minutos em aumento do aporte sanguíneo e diminuição da velocidade do fluxo de sangue. Após início de tais mudanças vasculares, os neutrófilos se aderem às células endoteliais e migram para fora do vaso nos espaços teciduais. Os macrófagos teciduais ativados decorrentes dessa migração secretam IL-1, IL-6 e TNF- α indutores de algumas alterações sistêmicas observadas nesse tipo de resposta inflamatória. Uma resposta aguda local pode ocorrer sem o envolvimento direto do sistema imune; entretanto citocinas liberadas no local da inflamação facilitam a aderência de células do sistema imune a células endoteliais vasculares e sua migração através da parede dos vasos (figura 2). A proteína C reativa liga-se a uma ampla variedade de microrganismos e ativa o complemento, resultando na deposição de opsonina C3b que fagocitará microrganismo (KUBY et al., 2008).

Os eicosanóides não são encontrados pré-formados nas células, são produzidos a partir de precursores fosfolipídicos quando necessários. Eles representam os mediadores e moduladores mais importantes da resposta inflamatória (RANG et al., 2007). O substrato para

formação dos eicosanóides é o ácido araquidônico (AA); a partir da lesão celular ou liberação de estímulos inflamatórios, tais como: ação da trombina nas plaquetas, do fator do complemento C5a nos neutrófilos, da bradicinina nos fibroblastos, das reações antígeno-anticorpo nos mastócitos e da lesão celular promovida por diferentes agentes (ROS – espécies reativas de oxigênio, UV-B, agentes químicos), a enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) citosólica é ativada liberando liso-PAF e AA (MORROW & ROBERTS-II, 2003; RANG et al., 2007).

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

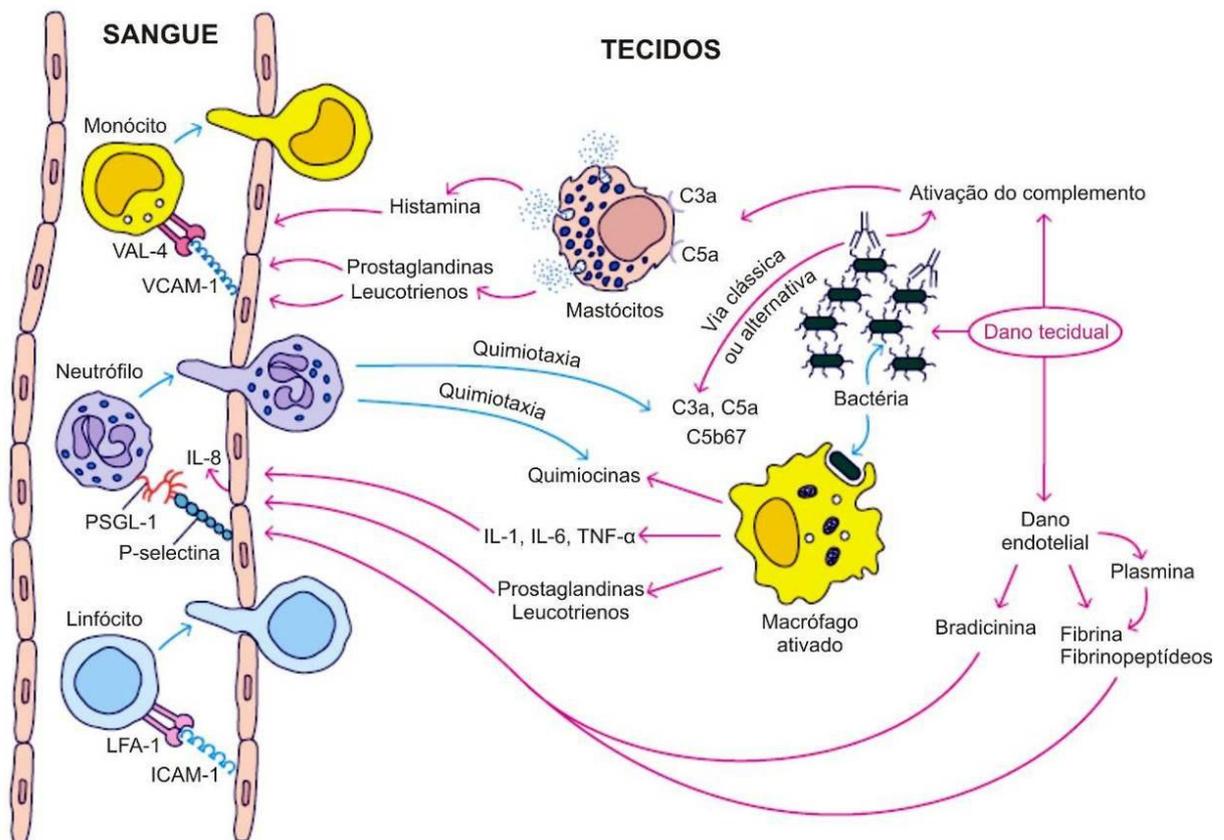


Figura 2: Visão geral das Células e Mediadores envolvidos em uma Resposta Inflamatória Aguda Localizada. Danos teciduais acarretam à formação de produtos do complemento que agem como opsoninas, anafilatoxinas e agentes quimiotáticos. Bradicininas e fibrinopeptídeos

induzidos por dano tecidual medeiam as mudanças vasculares. Os neutrófilos geralmente são os primeiros leucócitos a migrarem para dentro dos tecidos, seguidos por monócitos e linfócitos. Apenas algumas das interações envolvidas no extravasamento de leucócitos estão representadas. Fonte: KUBY et al., 2008, p. 370.

Na pele normal, a COX-1 encontra-se distribuída em toda epiderme, enquanto a COX-2 está localizada principalmente nos queratinócitos supra-basais, sendo essa isoforma prontamente induzida frente a um estímulo inflamatório (RAUH, 2008). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é a principal prostaglandina presente no tecido cutâneo, modulando vários eventos inflamatórios, como aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, favorecendo à formação do edema e adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos. Entretanto, o tráfego dos linfócitos a partir do lúmen pós-capilar para o meio intersticial já é um processo mediado em parte pelo LTB₄ (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). As PGE₂ e PGD₂, por sua vez induzem a transcrição de enzimas requisitadas para síntese de outra classe de eicosanóides envolvidos na fase resolutória da inflamação, por exemplo, as lipoxinas (SERHAN e SAVILL, 2005).

Outros mediadores químicos também desempenham importante papel no decorrer de um processo inflamatório cutâneo, como a histamina. Esta atua em vários eventos fisiológicos celulares, intervindo também nas reações alérgicas e na inflamação, sendo esse fato atribuído como um dos principais motivos dos mastócitos encontrarem-se localizados na microvasculatura dos tecidos que estão em contato com o meio externo como a pele, os pulmões e intestinos. A histamina é liberada através do processo de exocitose durante reações inflamatórias ou alérgicas, por meio da interação de fatores do sistema complemento (C3a e C5a) e de antígenos com anticorpos IgE fixados nos mastócitos. Após a degranulação dos mastócitos, a histamina atua em receptores específicos (receptores histaminérgicos) promovendo a constrição do músculo liso, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e prurido (RANG et al., 2007; SCHARAMM e THORLACIUS, 2004).

De forma resumida pode-se classificar as vias inflamatórias como dependentes do ácido araquidônico ou independentes do ácido araquidônico. Enzimas envolvidas na produção dos eicosanoides inflamatórios, como a COX, LOX e PLA₂, fazem parte da via inflamatória dependente de AA. Já estruturas moleculares como, por exemplo, o fator de transcrição NF- κ B (que ativa genes responsáveis pela expressão de quimiocinas, e citocinas e é ativado por

vários outros fatores, como os receptores TLR ou a presença de espécies reativas de oxigênio – ROS), a óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) que libera NO, são consideradas integrantes da via inflamatória independente de AA (ISSA et al., 2006).

A pele serve como um indicador de desordens endógenas e, nela também, refletem-se os danos oriundos da produção excessiva de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS) (PORTUGAL et al., 2007). Os radicais livres e ROS são formados por metabolismo celular e degradação química espontânea de algumas biomoléculas (GROSS et al., 2002). Um aumento nos níveis de ROS na pele pode levar a danos celulares que promovem várias condições patológicas, como respostas inflamatórias (SONG *et al.*, 2008). Além de que a superprodução ou remoção ineficiente de radicais livres, denominada estresse oxidativo, contribui com o surgimento de lesões na pele, expressas através de eritemas, edemas, envelhecimento, inflamação, manifestação auto-imune, hipersensibilidade, queratinização anormal e câncer de pele (PORTUGAL et al., 2007).

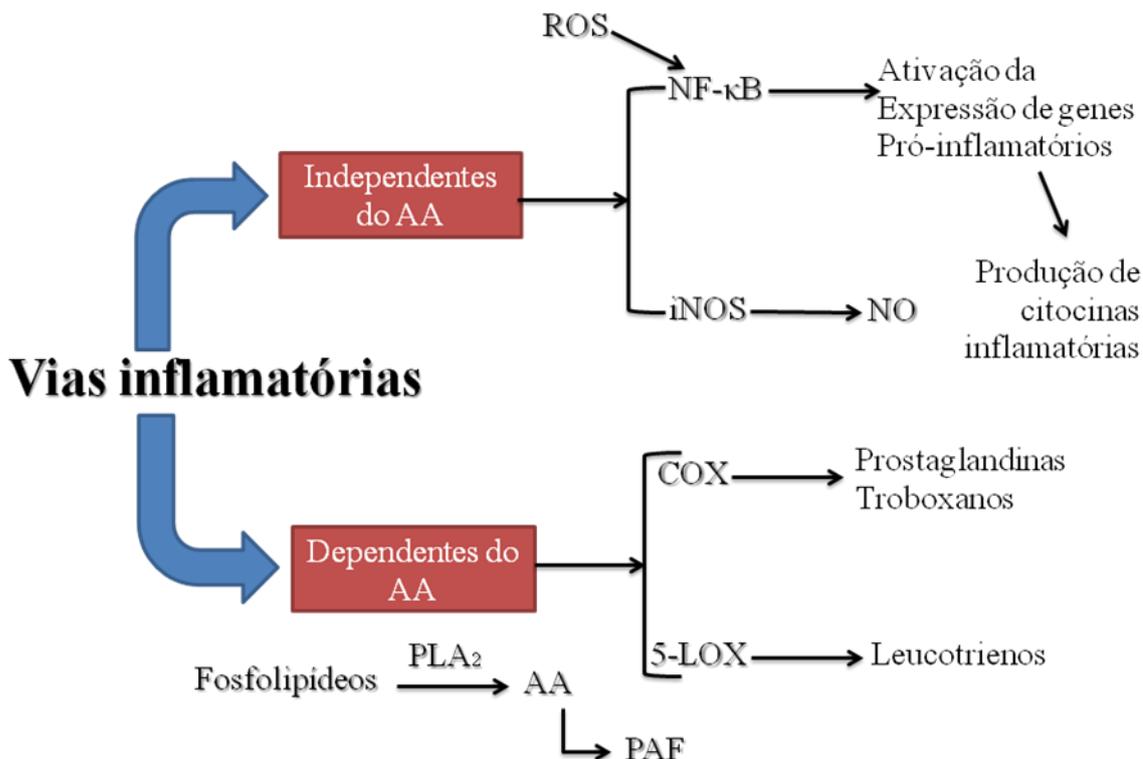


Figura 3: Vias inflamatórias dependentes e independentes do ácido araquidônico (AA).
 Fonte: Adaptado de ISSA et al., 2006. Designer autora.

2.3. Resistência bacteriana e a aminoglicosídeos

O termo resistente se refere àqueles microrganismos que não são inibidos pelas concentrações habitualmente alcançadas no sangue ou tecidos do correspondente antimicrobiano utilizado, ou aqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente estudado ao qual não havia uma adequada resposta clínica quando usado como tratamento (MOTA et al., 2005). A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversificados, estabelecendo-se entre microrganismos de uma mesma população ou de populações divergentes, bem como da microbiota animal para microbiota humana e/ou vice-versa (MOTA et al., 2005).

Nas décadas de 60 e 70 surgiram linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, concomitante ao aparecimento de cepas de *Escherichia coli* resistentes a ampicilina; resultantes do uso indiscriminado de penicilinas semi-sintéticas e cefalosporina e ampicilina respectivamente (ROSSI et al., 2005).

Enquanto a resistência microbiana cresce drasticamente, as pesquisas em termos de antibióticos estão tornando-se bem escassas. O percentual de publicações referentes a novas atribuições de resistências microbianas aumentou de 11% para 34% da década de 70 para década de 90 (SWARTZ, 2000).

O surgimento da resistência a antibióticos foi, é e provavelmente continuará a ser uma das maiores problemáticas da medicina; tendo em vista a causa determinada por mutação espontânea e recombinação gênica, o que cria uma variabilidade genética onde atua a seleção natural (MOTA et al., 2005). A resistência aparece pelo dinamismo do genoma bacteriano. Embora pequeno e econômico, as atividades essenciais de uma bactéria são codificadas por um só cromossomo, e as não-essenciais como defesas contra drogas e transferência gênica, são geralmente codificadas por elementos móveis (MOTA et al., 2005). Como conseqüências da situação de resistência instaurada estão o aumento da morbimortalidade entre pacientes, a redução do número de drogas utilizáveis por futuras gerações de pacientes, além do impacto econômico trazido pelos custos ao combater as novas infecções (McGOWAN JR, 2004).

Os aminoglicosídeos compõem uma classe de moléculas que apresentam um núcleo aminociclitol, podendo ser estreptidina ou a 2-desoxiestreptamina (JANA et al., 2006). São

ativos preferencialmente contra bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos aeróbicos (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999).

A não uniformidade da resistência bacteriana aos aminoglicosídeos de forma geral é o evento primordial nesse aspecto de resistência. Especialmente quando a resistência bacteriana é mediada por enzimas modificadoras, onde se observa um padrão de inativação diferente para cada enzima em relação aos variados aminoglicosídeos (BARROS, 2001). Vários mecanismos podem conferir resistência bacteriana aos aminoglicosídeos. Um primeiro mecanismo, a diminuição da permeabilidade, tende a conferir resistência em alto nível a praticamente todos os aminoglicosídeos simultaneamente, como ocorre com o evento de alteração na expressão da proteína de membrana OppA (uma proteína ligadora de oligopeptídeos) em cepas laboratoriais e clínicas de *Escherichia coli* (ACOSTA et al., 2000). As bombas de efluxo, formadas por proteínas triméricas são canais constitutivos da membrana celular, atuando na expulsão ativa de compostos tóxicos à célula, incluindo antimicrobianos, sendo potencializado efeito agindo de forma sinérgica à atuação das porinas (CHUANCHUEN, 2002).

Uma modificação que tem sido observada no quadro da resistência a aminoglicosídeos a nível mundial é o aumento da complexidade dos mecanismos, geralmente envolvendo a combinação de duas enzimas modificadoras distintas O-fosforilação ATP dependente (fosfotransferases: APH); O-adenilação ATP dependente (adeniltransferases, ou nucleotidiltransferases: ANT); e N-acetilação acetyl-CoA dependente (acetiltransferases: AAC) (WARN, 1997).

2.4. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica de elevada concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), causadores de danos moleculares às estruturas celulares, apresentando conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais, em variados tecidos e órgãos, como músculo, fígado, tecido adiposo, vascular e cerebral. O efeito deletério desse evento, entretanto, varia de forma

considerável entre os seres vivos, levando em consideração fatores como idade, estado fisiológico e dieta alimentar (VANCINI, 2005).

Radicais livres são considerados substâncias que carregam um elétron desemparelhado. São espécies altamente reativas e multiplicam-se no curso de vários processos fisiológicos, em especial eventos da cadeia respiratória, devido a redução parcial de oxigênio, e oxidações catalisadas pelas oxigenases. Tais reações ocorrem comumente, uma vez que o oxigênio é excelente aceitador de elétrons, formando as descritas espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais incluem radicais como radicais hidroxil (OH^\bullet) e ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^{\bullet-}$); bem como moléculas não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito (ONOO^-), ácido hipocloroso (HOCl^\bullet), ânion hidroxila (HO^-) entre outros. Esses compostos possuem alta reatividade e podem dirigir à lipoperoxidação, oxidação de carboidratos, proteínas e DNA (PRATICÓ e DELANTY, 2000).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos pela ação de diversos antioxidantes, podendo ser de origem endógena (superóxido dismutase) ou provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Entre essas fontes destacam-se os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides. Uma vez havendo limitação da disponibilidade de compostos antioxidantes, podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo. Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que estes ataquem os alvos biológicos nas células (SOUSA et al., 2007).

O estresse oxidativo relaciona-se com diversas patologias, uma vez que alterações no equilíbrio redox podem ser tóxicas, e determinantes do tempo de vida celular (PARKES et al., 1998). Os metabólitos de EROs associam-se a processos neurodegenerativos e outras patologias como câncer, catarata, isquemia, efisema pulmonar, envelhecimento precoce, além de reações inflamatórias. Onde nessas condições, macrófagos e neutrófilos produzem EROs como primeira linha de defesa contra bactérias, vírus, metástases e demais agentes invasores estranhos ao organismo (HAVSTEEN, 2002; FUJITA et al., 1988). Além disso, a produção de radicais livres acelera a formação de eicosanóides e citocinas, exacerbando a resposta inflamatória. Tal reação é um importante mecanismo de defesa, no entanto um excesso na formação de EROs pode levar à oxidação e perda de função de moléculas essenciais (grupos sulfidrílicos de proteínas e enzimas, lipídeos de membrana, ácidos nucleicos) (HADDAD, 2002).

2.5. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae)

Pertencente a ordem Malpighiales, a família Caryocaraceae contém 25 espécies (STEVENS, 2008) das quais 15 são encontradas na flora brasileira (BARROSO *et al.*, 2002); é predominantemente neotropical e apresenta dois gêneros: *Anthodiscus* e *Caryocar* (KERR *et al.*, 2007). A origem do nome *Caryocar* provém do grego *Karyon*=noz, núcleo + *caro*= carne (KERR *et al.*, 2007).

O cerrado, a segunda maior vegetação brasileira (SANO e ALMEIDA, 1998) abriga caracteristicamente espécies comuns do gênero *Caryocar*, como *Caryocar brasiliense* Camb. (FERNANDES, 2004) e *Caryocar coriaceum* Wittm. (LORENZI, 1992). Há presença marcante de *C. brasiliense* Camb. em regiões do sul dos estados da Bahia, Maranhão, Pará, norte do Mato Grosso, Goiás, Paraná e Tocantins, ainda em Minas Gerais, Piauí, Rondônia, São Paulo e Ceará (SANO e ALMEIDA, 1998; EITEN, 1972; KERR *et al.*, 2007). Já a espécie *C. coriaceum* Wittm. é comumente encontrada em regiões de cerrado nos estados da Bahia, Goiás, Piauí, Ceará e Pernambuco (LORENZI, 1992).

Localizada na divisa dos estados brasileiros Ceará, Piauí e Pernambuco (figura 4), a Chapada do Araripe abriga uma Floresta Nacional (1946), uma Área de Proteção Ambiental (1997) e um Geoparque (2006). Apresenta uma área de 55.000km² (AUGUSTO e GOES, 2007), na região do Cariri – Crato, Ceará – instiga a atenção da comunidade científica por sua estrutura geológica (bacia sedimentar), suas jazidas fossilíferas, seu clima e suas diferentes formações vegetais (SARAIVA, 2009), as quais podem, de maneira simplificada, ser estratificadas em mata úmida, cerradão, cerrado, carrasco e caatinga (AUGUSTO e GOES, 2007). Exclusivamente situa-se uma área preservada do bioma Cerrado (COSTA, ARAÚJO e LIMA-VERDE, 2004) encontrando-se predominantemente a espécie nativa oleífera *Caryocar coriaceum* Wittm. (FIGUEIREDO *et al.*, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2004).



Figura 4: Chapada do Araripe: Localização geográfica, entre os limites dos estados de Ceará, Piauí e Pernambuco. Fonte: <<http://maps.google.com.br/maps>>.

Caryocar coriaceum, é uma espécie arbórea frondosa, ultrapassando 10 metros de altura, conhecida popularmente por piquizeiro (*py-qui*, *py-pele*, casca; qui-espinho; casca espinhenta – decorrente da presença de espinhos no endocarpo interno) (LORENZI, 1992), de tronco tortuoso, áspero e sulcado, apresentando casca espessa e cor acinzentada (figura 5). Os ramos são grossos e as folhas opostas e trifolioladas, folíolos ovais, verde-luzentes, aveludados e mais ou menos coriáceas, com ausência de pelos (figura 6). Suas flores são grandes de pétalas amareladas e adjuntas em cacho (SILVA e MEDEIROS FILHO, 2006; BRAGA, 1960;). Segundo Silva et al., 2006, as folhas primárias surgem 30 dias após a emergência da plântula, seguindo pela formação de um novo par, sendo estes simples, opostos cruzados, glabros, de consistência membranácea, nervação do tipo penínérvea, ápice arredondado, de base cuneada e margens serradas; surgindo o terceiro par, as folhas assumem caráter definitivo (descrito acima).



Figura 5: Pequi (*Caryocar coriaceum*) – árvore. Localizada na Chapada do Araripe, Crato-CE. Março de 2009. Fonte: SARAIVA, 2009.



Figura 6: Aspecto geral da folha de *C. coriaceum* Wittm. (pequi). Parte anterior (esquerda) e posterior (direita). Fonte: autora.

O fruto mostra-se drupáceo, ovóide, constituído de epicarpo, mesocarpos interno e externo e endocarpo, onde o mesocarpo interno (polpa do fruto) é comestível, oleaginoso e aromático, de coloração amarelada; sendo o epicarpo de coloração verde-escura e o endocarpo castanho-escuro, envolvido externamente por espinhos (BARRADAS, 1971; PAULA-JÚNIOR, 2004; BRAGA, 1960).

O *C. coriaceum* apresenta comportamento sazonal, com período de floração ocorrente entre os meses de Setembro e Novembro e sua frutificação entre os meses de Dezembro e Abril, período tal conhecido como o da safra do pequi (BRAGA, 1960; COSTA; ARAUJO & LIMA-VERDE, 2004). Comunidades circunvizinhas da cidade de Crato e encostas da Chapada do Araripe dedicam-se a coleta do fruto do pequizeiro e extração de seu óleo na floresta de forma artesanal, demonstrando sua atividade rentável (LIMA et al., 2006). Além de sua importância econômica, possui relevância nutricional e medicinal verificada mediante estudos (OLIVEIRA et al., 2004; LIMA et al., 2006). Dentre as atribuições farmacológicas refere-se ação antiinflamatória tópica e cicatrizante (SARAIVA et al., 2010; QUIRINO, 2009).

Na medicina tradicional faz-se uso das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess., na forma de decocto, contra gripes, resfriados e disfunções menstruais, podendo atribuir também tais utilidades à espécie *Caryocar coriaceum* Wittm (AGRA et al., 2007). Aplicam-se também, na forma de infusão, para o tratamento de doenças hepáticas (BEZERRA et al., 2002). Ainda, o extrato etanólico das folhas apresentou atividade contra sarcoma 180 que é um tipo de câncer de pele (OLIVEIRA et al., 1968).

Bezerra et al (2002), verificaram atividade tóxica de *Caryocar brasiliense* contra *Biomphalaria glabrata*, quanto a ação moluscicida. Cardoso (2001) tratou grupos de camundongos com extrato bruto das folhas de *C. brasiliense* contra proliferação de *Leishmania amazonensis*, apesar de não terem adiado o desenvolvimento das lesões, mantiveram-nas menores comparados ao grupo controle.

Marques et al (2002), investigaram efeito fungitóxico de *Caryocar brasiliense* Cambess. sobre a germinação de esporos da *Botrytis cineria*, *Colletotrichum truncatum* e *Fusarium oxysporum*, sendo que de todos os extratos testados entre folhas, botão floral e mesocarpo, nenhum apresentou atividade. Da mesma forma, Passos et al (2002), através da técnica de diluição em ágar, verificou a atividade antifúngica de diferentes constituintes de *C. brasiliensis* Cambess. sobre *Cryptococcus neoformans*, observando inibição.

A partir do extrato metanólico das folhas do pequi, Moreira et al (2002), testaram o potencial alelopático sobre germinação de sementes de *Panicum maximum*, demonstrando valores de inibição entre 50% e 75%.

Ribeiro et al (2009) realizou prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico das folhas de *C. brasiliense*, verificando a presença flavonóides, saponinas, taninos e glicosídeos cardiotônicos, bem como a ausência de alcalóides e glicosídeos antraquinônicos. Da mesma forma, Paula-Junior (2004) ao realizar a abordagem fitoquímica do pequi, verificou também presença de flavonóides e saponinas, além de óleos essenciais, taninos condensados e hidrolisáveis.

Ainda no trabalho de Paula-Junior (2004) foi observada atividade antioxidante e antimicrobiana de *C. brasiliense* Cambess. O extrato das folhas ainda apresenta ação antimicrobiana contra cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, avaliada pelo método de difusão em ágar; sendo também eficiente contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis in vitro*, bem

como contribui para o desenvolvimento dos fungos patogênicos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis*.

A literatura relata ainda a presença de vários compostos nas folhas da espécie *C. brasiliense* como friedelina, friedelanol, ácido oleanóico, β -sitosterol, estigmasterol, ácido elágico, β -amirina e ácido oleanóico (OLIVEIRA et al., 1968), heterosídeos antociânicos, saponinas, taninos, flavonóides, esteróides e osídios redutores em folhas (MAGALHÃES et al., 1988); açúcares redutores, taninos, flavonóides, esteróides, triterpenos e saponinas na folha e botão floral (MARQUES, 2001);

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Identificar quimicamente e verificar o potencial farmacológico *in vivo* e *in vitro* do extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm.

3.2. Objetivos específicos

- Identificar as principais classes químicas presentes no extrato e fração das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório tópico do extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas de *C. coriaceum* Wittm. através de modelo de edema de orelha (agudo e crônico) induzido por diferentes agentes flogísticos;
- Investigar possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória para o extrato e fração metanólica através de seu efeito sobre variados agentes flogísticos: óleo de croton, ácido araquidônico, fenol e histamina;
- Verificar o potencial antioxidante do extrato e fração, determinando sua concentração eficiente em 50% (CE₅₀);
- Avaliar ação antibacteriana e antifúngica, bem como efeito modulatório do extrato e fração de *C. coriaceum* Wittm. frente a cepas Gram-positivas e Gram-negativas e multirresistentes;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais utilizados

4.1.1. Material permanente e equipamentos utilizados

- Balança analítica de precisão (Metler Toledo AB204)
- Banho-maria (Modelo 100, Fanem Ltda.)
- Estufa de secagem e esterilização
- Espectrofotômetro
- Liofilizador
- Materiais de biossegurança
- Material cirúrgico
- Perfurador de couro (circunferência de 6 mm Ø)
- Pipetas automáticas (Maxipette)
- Placas de microtitulação
- Rotaevaporador (Fisatom)
- Relógios
- Seringas estéreis (1 mL, 3 mL e 5 mL)
- Tubos Eppendorffs
- Vidrarias gerais

4.1.2. Substâncias, reagentes e soluções

SUBSTÂNCIA	ORIGEM
Acetato de etila P.A.	Dinâmica, Brasil
Acetona P.A. (propanona)	Dinâmica, Brasil
Ácido acético P.A.	Fluka, Alemanha
Ácido araquidônico	Sigma, USA
Ácido ascórbico	Vetec, Brasil
Ácido clorídrico 10% e 1%	Vetec, Brasil
Brain Heart Infusion (BHI)	Biosystems, Brasil
Cloreto de ferro	Dinâmica, Brasil
Cloridrato de cetamina 10% (Cetamin®)	Syntec, Brasil
Cloridrato de xilazina 2% (Xilazin®)	Syntec, Brasil
Draggendorff	Vetec, Brasil
Dexametasona (Decadron®)	Ache, Brasil
Etanol P.A.	Dinâmica, Brasil
Éter etílico	Dinâmica, Brasil
Fenol 99%	Sigma-Aldrich, USA
Hidróxido de sódio 40%	Dinâmica, Brasil
Agar Heart Infusion (HIA)	Difco, Brasil
Histamina	Sigma, USA
Indometacina (Indocid®)	Merck Sharp & Dohme, Brasil

Metanol	Synth, Brasil
Óleo de cróton	Sigma, USA
Solução fisiológica NaCl 0,9%	FARMACE, Brasil

4.2. Aspectos éticos da pesquisa

O projeto de dissertação foi embasado junto às normas de Bioética reconhecidas pela lei: 11.794/08, a qual regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos; E cria as comissões de ética para uso de animais em instituições de pesquisa (GOLDIM e RAYMUNDO, 2008). Foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR) para avaliação dos protocolos experimentais, sendo aprovado com número de registro: 10-020.

4. 3. Material botânico



Figura 7: Exsicata de *Caryocar coriaceum* Wittm. (pequizeiro). Coleta: Outubro de 2008, em área de Cerrado na Chapada do Araripe, Crato-CE (7°21' S; 39°28'W; Altitude: 892 m) (SARAIVA, 2009).

As folhas do pequizeiro para preparação do extrato liofilizado foram obtidas da espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. em área de cerrado na Chapada do Araripe (Fazenda Barreiro Grande, Crato-CE, 7°21' S; 39°28' W; altitude : 892m), coletados no mês de março de 2010 por intermédio de moradores locais. A exsicata da planta (figura 7) foi identificada pela Prof^a. Dra Lígia Queiroz Matias e depositada no Herbário Prisco Bezerra (Universidade Federal do Ceará), sob nº 44523.

4.4. Obtenção do extrato e Fracionamento

As folhas do pequizeiro foram postas para secagem por um período de 48h entre intervalos de sol forte. Em seguida 194.97g das folhas trituradas foram acondicionadas em frasco de vidro juntamente com 1L da mistura água/ etanol (1:1). Após 72h, o etanol foi destilado em evaporador rotativo (rotação entre 27 a 30 rpm, 45°C), seguido de liofilização, concluindo o procedimento.

O extrato obtido foi fracionado por filtração a vácuo, utilizando quatro solventes (em escala de polaridade) hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. O melhor rendimento foi dado pelo metanol: 15.59% resultando em fração metanólica (figura 8).

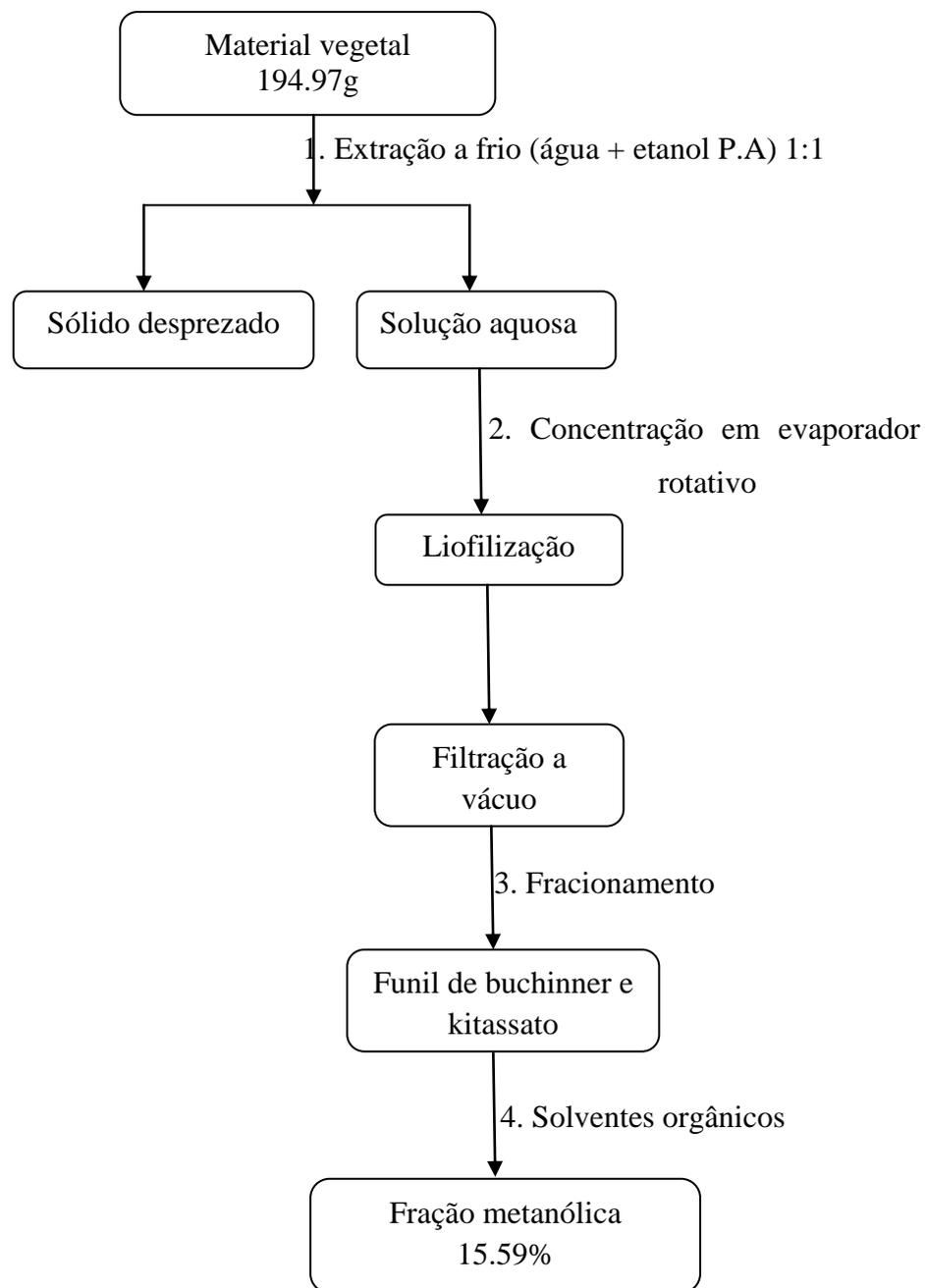


Figura 8: Etapas de obtenção do extrato das folhas do pequi e fracionamento.

4.5. Prospecção fitoquímica

A pesquisa fitoquímica visa o conhecimento dos constituintes químicos presentes em espécies vegetais. Podendo ser definido na análise fitoquímica preliminar grupos relevantes de metabólitos secundários da espécie determinada (SIMÕES et al., 2007). A prospecção fitoquímica seguiu a proposta de Matos, 1997 considerando suas etapas de determinação quanto à classe e subclasse do metabólito secundário. O processo se refere a exposição do produto natural em meio ácido ou básico resultando em colorimetria e/ou precipitação no referente meio.

4.6. Identificação em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

A cromatografia de alta eficiência consiste em um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos, devido a sua adaptabilidade para determinar quantitativamente com boa sensibilidade, possibilitando a separação de espécies não voláteis e termicamente instáveis, destacando-se na indústria farmacêutica, assim como sua aplicabilidade em determinações ambientais e em outros campos da ciência (TONHI et al., 2002).

As análises cromatográficas foram realizadas na Universidade Federal de Santa Maria (Rio Grande do Sul), usando sob condições de gradiente coluna C₁₈ (octadecilsílica). A fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético e metanol, e o gradiente de composição: 5% metanol por 2 min, 25% metanol até 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80% metanol a cada 10 min. Banco de soluções de referências padrões foram preparados em HPLC de fase móvel em um intervalo de concentração de 0,050-0,250 mg/mL para quercetina e rutina, e 0,020-0,200 mg/mL para os ácidos gálico, clorogênico e caféico. O equipamento básico em CLAE contém 1) reservatório da fase móvel, 2) bomba de alta pressão, 3) válvula de injeção, 4) coluna, 5) detector e 6) registrador. As fases móveis utilizadas devem conter alto grau de pureza, sendo dissolvidas, filtradas e degaseificadas antes do uso. A bomba de alta pressão para eluição da fase móvel deve proporcionar ao sistema de vazão continuidade sem pulsos com alta

reprodutibilidade; as válvulas de injeção possuem alça de amostragem para introdução da amostra com uma seringa; as colunas são geralmente de aço inoxidável, com comprimento variável e reaproveitáveis. O detector mais utilizado é o ultravioleta, sendo também empregados detectores de fluorescência entre outros; o registro de dados pode ser feito através de um registrador, um integrador ou um microcomputador (DEGANI et al., 1998).

4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana

4.7.1. Microorganismos

Os experimentos foram realizados com as linhagens padrões bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362 e multiresistentes *S. aureus* 358 (SA358) e *E. coli* 27 (EC27), e fungicas *Candida albicans* ATCC 40006, *C. krusei* ATCC 6258 e todas obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Os estoques de culturas foram mantidos em Agar Heart Infusion (HIA) e armazenado em um refrigerador.

4.7.2. Meios de cultura

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

4.7.3. Drogas

Para avaliar as substâncias como moduladores da ação antibiótica foi utilizados antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (canamicina, amicacina, neomicina e gentamicina), e para avaliar a modulação da ação dos antifúngicos foram utilizados metronidazol, anfotericina B, nistatina, benzoilmetronidazol.

4.7.4. Concentração Inibitória Mínima – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) foi determinada em BHI 10% pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10^5 UFC/mL e uma concentração da droga 1024- $1\mu\text{g/mL}$ (JAVADPOUR et al., 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado. Para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos, a concentração subinibitória foi determinada pelo MIC/8 com valores de (16 $\mu\text{g/mL}$) para EC27 e SA358 (cepas bacterianas) assim como para as cepas fúngicas. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C utilizando para a leitura das cepas bacterianas o corante resazurina e turbidez para as cepas fúngicas.

4.7.5. Modulação

Para avaliar atividade moduladora da ação de antibióticos, a solução e as drogas teste foram misturadas em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias, prreparadas com água destilada estéril em concentrações de 1024 $\mu\text{g/mL}$ e volumes de 100 μL diluídas seriadamente 1:2. Na placa de microdiluição, cada poço conteve 100 μL de um preparado de caldo BHI 10% (150 μL do inóculo) e a solução na concentração determinada pela CIM/8 (concentração

inibitória mínima/8) totalizando um conteúdo de 1,5 mL. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h.

4.8. Ensaios de atividade anti-inflamatória tópica

4.8.1. Animais

Para os ensaios farmacológicos foi utilizada espécie de roedor: camundongos *Swiss* (*Mus musculus*), com massa corpórea correspondendo a 20-30g aproximadamente, de ambos os sexos, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), monitorados na Unidade de contenção de animais da URCA em conformidade com as normas de Bioética reconhecidas por lei (GOLDIM e RAYMUNDO, 2008). Acondicionados em gaiolas de propileno, com aclimatização em temperatura média de 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas cada, tendo livre acesso a ração (Labina, Purina®) e água potável.

4.8.2. Edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de croton

Esse modelo de inflamação cutânea aguda permite identificar inibidores da biossíntese das prostaglandinas e leucotrienos, sendo amplamente utilizado na triagem de compostos pertencentes à classe dos inibidores da COX e/ou LOX, bem como compostos com atividade corticóide-*símile* (GÁBOR, 2000).

Os animais (camundongos *Swiss*; n = 7 / grupo) tiveram suas orelhas direitas pré-tratadas topicamente com salina 0,9%, dexametasona 4mg/mL ou concentrações 2 e 1mg/orelha de EHFCC ou EHFCC-FM (aplicações de 20 μL : 10 μL face externa e 10 μL face interna das orelhas), esperado 15 minutos para absorção. Após 1h aplicou-se 20 μL do agente flogístico óleo de cróton 5% (v/v) em acetona nas orelhas direitas e 20 μL do veículo acetona nas orelhas esquerdas. Decorridas 6h, os animais foram submetidos ao sacrifício por

deslocamento cervical para posterior retirada das orelhas, cortadas em discos de 6 mm de diâmetro (com perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (TUBARO, 1985).

4.8.3. Edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de croton

Para realização desse estudo crônico, os animais (camundongos *Swiss*; n = 7 / grupo) foram submetidos a aplicação tópica de óleo de cróton 5% (v/v) diluído em acetona nas orelhas direitas e 20µL do veículo acetona nas orelhas esquerdas em dias alternados durante nove dias. No quinto dia de experimentação, os animais receberam tratamento (via tópica-20µL) com salina 0,9%, dexametasona 4mg/mL e EHFCC ou EHFCC-FM nas concentrações 2 e 1mg/orelha completando o ciclo de nove dias de experimentação. Sendo esse tratamento realizado duas vezes em períodos distintos (manhã e tarde). Ambas as orelhas tinham mensurações diárias com uso de paquímetro digital durante todo o período do teste. Após os nove dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e suas orelhas retiradas em discos de 6 mm de diâmetro (com perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (STANLEY et al., 1991).

4.8.4. Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

Para avaliação da atividade tópica neste modelo, os animais (camundongos *Swiss*; n = 7 / grupo) tiveram suas orelhas direitas pré-tratadas com 20µL de solução salina, indometacina 100mg/mL, EHFCC ou EHFCC-FM nas concentrações 2 e 1mg/orelha, esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de ácido araquidônico 0,1 mg/µL em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 µL do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 1h deu-se o sacrifício por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para análise conforme supracitado no itens anteriores (YOUNG et al., 1984; CRUMMEY et al., 1987).

4.8.5. Edema de orelha induzido por fenol

Nessa avaliação, as orelhas direitas de camundongos Swiss (n = 7 / grupo) foram pré-tratadas, topicamente, com 20 µL de solução salina, dexametasona 4 mg/mL ou concentrações de 2 e 1mg/orelha de EHFCC ou EHFCC-FM, esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 µL de fenol 10% (v/v) diluído em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 µL do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 1 hora, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, obtendo-se discos de 6 mm de diâmetro para análise do edema conforme supracitado (GÁBOR, 2000).

4.8.6. Edema de orelha induzido por injeção subcutânea de histamina

Inicialmente, cada animal (n = 8 / grupo) foi anestesiado com cloridrato de cetamina 0,02 mL (i.p.) e cloridrato de xilazina 0,01 mL (i.p.). Em seguida, receberam pré-tratamento tópico com 20µL de salina, dexametasona 4mg/mL ou EHFCC. Após 30minutos, foi administrado um volume de 5µL de uma solução de histamina (100 mg/mL de salina), intradermicamente, na região ventral da orelha direita dos camundongos com o auxílio de uma agulha hipodérmica 29 G, enquanto que a orelha esquerda recebia o mesmo volume de salina, também intradermicamente. Após 2 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical para posterior avaliação do edema a partir das massas dos discos obtidos, conforme item citado anteriormente (BRAND et al., 2002).

4.8.7. Quantificação do edema e do efeito inibitório médio

Para quantificar o percentual de inflamação em cada animal testado, o edema de orelha, expresso em percentual de aumento da massa da orelha, foi calculado utilizando a fórmula:

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

onde **mod** é a massa (em gramas) do disco obtido da orelha direita e **moe** é a massa (em gramas) do disco obtido da orelha esquerda. Já o cálculo do efeito inibitório médio da inflamação (**EIM**, em %), dá-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 **MPEtrat** (em %) é a média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento com extrato e fração ou fármaco padrão e **MPEcont** (em %) é a média do percentual de edema do grupo controle negativo (tratado com salina).

4.9. Avaliação de atividade antioxidante por seqüestro de radicais livres

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada através de sua habilidade em extinguir o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhdrazil (DPPH), de acordo com Choi et al (2002), com pequenas modificações. EHFCC e EHFCC-FM em concentrações que variam de 6,25-50 µg / mL diluído em veículo etanol foram incubadas na ausência (em branco) ou presença de 0,3 mM de DPPH solução de etanol no escuro e em temperatura ambiente. Ácido L-ascórbico (em concentrações que variam 1,1-5,5 µg / mL) foi utilizado como controle positivo. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em 518 nm. Limpeza ou a capacidade inibitória em porcentagem (% IC) foi calculado através da seguinte equação:

$$CE\% = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 / Abs_{control}]$$

onde $Abs_{amostra}$ é a absorvância obtida na presença de concentrações diferentes de EHFCC ou EHFCC-FM na presença de DPPH solução de etanol, Abs_{branco} é a absorvância obtida na presença de concentrações diferentes de EHFCC ou EHFCC-FM, na ausência de DPPH solução de etanol (em branco) e $Abs_{control}$ que é a obtida na ausência de extratos e na presença de DPPH solução de etanol sem qualquer extrato ou controle positivo. A capacidade de seqüestrar radicais livres (FRSC) de EHFCC e EHFCC-FM foi calculada como seus valores CE_{50} (a concentração necessária para inibir 50% na formação de radicais), usando o método de Dixon e Webb. Os testes foram realizados em quadruplicata.

4.10. Análise estatística para experimentação *in vivo*

Os resultados são expressos em média \pm erro padrão das médias (E.P.M). Os dados numéricos são submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Student-Newman Keuls, sendo aceitos como diferenças significativas valores de $p < 0,05$. Para os ensaios cuja avaliação das amostras se deu em vários dias, 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 $P < 0,05$.

5. CAPÍTULO I

**Perfil fitoquímico e ação sensibilizante *in vitro*
do extrato e fração das folhas de *Caryocar
coriaceum* Wittm. na presença de
aminoglicosídeos e antifúngicos.**

RESUMO

Inúmeros estudos relatam eficácia de extratos de plantas em tratamentos terapêuticos, devido a suas propriedades químicas. A espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) é conhecida popularmente no Brasil por pequizeiro, comumente encontrada em regiões de cerrado, na Chapada do Araripe, sul do Ceará. O presente trabalho tem como objetivo conhecer parte da composição química, identificando principais os compostos presentes e avaliar ação antibacteriana e moduladora do extrato hidroetanólico das folhas de *C. coriaceum* Wittm. (EHFCC) e fração metanólica (EHFCC-FM), na presença de aminoglicosídeos. A composição química foi realizada por método colorimétrico e cromatográfico e para análise antibacteriana foi seguido o teste de microdiluição em caldo, realizados com as linhagens bacterianas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362 e multiresistentes *S. aureus* 358 (MRSA) e *E. coli* 27 (EC27). Para os testes de modulação foram utilizados os antibióticos aminoglicosídeos e o antifúngico Anfotericina B. O extrato e fração não demonstraram efeito inibitório mínimo para as cepas testadas. Foi demonstrada atividade moduladora sinérgica para *E. coli* multiresistente e *S. aureus* 358 para o extrato (EHFCC) e fração (EHFCC-FM). Foram determinados majoritários os componentes rutina e ácido clorogênico. O resultado é visto como subsídio eficaz no combate à resistência a aminoglicosídeos e passível de desenvolvimento de trabalhos futuros com as substâncias majoritárias, a fim de afirmar sua ação.

Palavras chave: sinergismo, prospecção, antibacteriana, extrato, folhas, *Caryocar coriaceum*.

Perfil fitoquímico e ação sensibilizante *in vitro* do extrato e fração das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm. na presença de aminoglicosídeos ou antifúngicos.

Mariana K. A. Araruna¹, Karla K. A. Santos², Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga², José G. M da Costa³, Henrique D. M. Coutinho², Irwin R. A. de Menezes¹

¹Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM), ²Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais³, Universidade Regional do Cariri – URCA, Crato, Ceará.

Introdução

Os produtos naturais são utilizados na medicina tradicional desde tempos remotos. A crença no poder curativo das plantas está fundamentada no conhecimento cultural e/ou empírico (LULLMANN et al., 2008). Apesar das observações populares deterem uma relevante contribuição para as atribuições e virtudes da substância natural (MACIEL et al., 2002), a grande maioria desses vegetais ainda não foi estudada quanto a sua composição química e reais indicações terapêuticas (PEREZ, 2004).

O uso intenso de antibióticos favorece o desenvolvimento de defesas relacionadas a agentes antibacterianos, direcionando o organismo à resistência (PIETRO et al., 2002). Tal fato limita o tratamento de determinadas patologias, estimulando voltar à atenção para o estudo de novas substâncias promissoras ao desenvolvimento de multidrogas (KEITH et al., 2005). Substâncias naturais derivadas de plantas representam alternativas interessantes no combate à resistência de agentes infecciosos (LU et al., 2007). Inúmeros estudos relatam eficácia de extratos de plantas em tratamentos terapêuticos, devido a suas propriedades químicas (GURIB-FAKIM et al., 2006).

A espécie *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) é conhecida popularmente no Brasil por pequizeiro, comumente encontrada em regiões de cerrado, na Chapada do Araripe, sul do Ceará (COSTA et al., 2004), onde exerce importante papel sócio-econômico, estendido aos estados circunvizinhos Pernambuco e Piauí (DE OLIVEIRA et al., 2010). Suas folhas são utilizadas na medicina tradicional no combate a gripes e resfriados (AGRA et al., 2007). O extrato das folhas de *C. brasilienses* demonstrou ação antimicrobiana ao inibir o crescimento de enterobactérias (PAULA-JUNIOR et al., 2006).

Os aminoglicosídeos são potentes alvos de ribossomos bacterianos, e o aumento dos casos de resistência bacteriana aos aminoglicosídeos é avaliado como ameaça grave à saúde (JANA et al., 2006).

O referido trabalho tem como objetivo conhecer parte da composição química, identificando os principais compostos presentes, também avaliar ação antibacteriana e moduladora do extrato hidroetanólico das folhas de *C. coriaceum* Wittm. (EHFCC) e fração metanólica (EHFCC-FM), na presença de aminoglicosídeos, bem como subsidiar conhecimento a respeito dessa espécie, ainda pouco estudada considerando sua parte foliar.

Materiais e Métodos

Material botânico: As folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm. foram coletadas em área de Cerrado na Chapada do Araripe, Crato, Ceará, Nordeste, Brasil (S 7°21'53,1"; W 39°28'42,6") em abril de 2009. A espécie foi confirmada pela profa. Dra. Lígia Queiroz Matias e depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, com número 44523.

Obtenção do extrato: Foi realizada uma extração hidroetanólica a frio do material coletado, em proporção 1:1 por um período de 72h. A mistura obtida foi concentrada em evaporador rotativo e banho-maria, seguido de liofilização. Para obtenção da fração, utilizaram-se quatro solventes (em escala de polaridade), tendo como método a filtração a vácuo, utilizando funil de Buchinner e kitassato. O melhor rendimento foi dado pelo metanol.

Análise fitoquímica: A análise dos constituintes químicos seguiu a proposta de Matos, 1997 onde a partir de uma solução do extrato, são distribuídas porções para verificar por meio de reação ácido ou base de coloração e/ou precipitação a presença ou ausência de compostos fenólicos, flavonóides e taninos. Para o teste de alcalóides, utiliza-se um funil de decantação em meio clorofórmico.

Quantificação de compostos fenólicos e flavonóides por HPLC-DAD: As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob condições de gradiente usando coluna C₁₈ (4,6 mm x 250 mm) empacotada com partículas de diâmetro de 5µM, a fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético e metanol, e o gradiente de composição: 5% metanol por 2 min, 25% metanol até 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80% metanol a cada 10 min. Todas as amostras e a fase móvel foram filtrados em membrana de 0.45µM filtro (Millipore) e desgaseificadas em banho de ultra-som antes do uso. Banco de soluções de referências padrões foram preparados em HPLC de fase móvel em um intervalo de concentração de 0,050-0,250 mg/ml para quercetina e rutina, e 0,020-0,200 mg/ml para os ácidos gálico, clorogênico e caféico.

Cepas bacterianas: Os experimentos foram realizados com as linhagens padrão de bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362 e multiresistentes *S. aureus*

358 (MRSA) e *E. coli* 27 (EC27), e fungos *Candida albicans* ICB 12 e *Candida krusei* ATCC 6258, obtidas da coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Todas as cepas foram mantidas em Heart Infusion Agar slants (HIA; Difco), sendo cultivadas durante 24h a 37°C em Brain Heart Infusion (BHI, Difco) anteriormente ao ensaio. O isolado clínico EC27 é resistente a neomicina e gentamicina (baixo nível) e a amicacina e canamicina (COUTINHO et al., 2005). O *S. aureus* (MRSA) apresenta resistência a meticilina.

Drogas: Utilizaram-se os antibióticos aminoglicosídeos: amicacina, canamicina, gentamicina e neomicina. E como antifúngicos utilizou-se metronidazol, anfotericina B, nistatina, benzoilmetronidazol. As soluções das drogas foram preparadas seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (NCCLS 2003).

Preparo das soluções iniciais: A amostra foi inicialmente solubilizada em Dimetilsulfóxido (DMSO- Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo observadas as seguintes proporções: 200 mg da amostra solubilizados em 1ml de Dimetilsulfóxido DMSO, para obter uma concentração inicial de 200 mg/ml. A partir desta concentração, será efetuada uma diluição 1:20 em água destilada estéril (10 mg/ml). Em seguida, esta solução será diluída para concentração 1024µg/ml, da mesma forma e a partir desta, efetuaram-se diluições seriadas 1:2 em meio de cultura, obtendo-se concentrações variando de 512 a 0,4 µg/mL.

Concentração inibitória mínima: A concentração inibitória mínima (CIM µg/mL) foi determinada em BHI 10% pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10^5 UFC/mL e uma concentração da droga 1024-1µg/mL (JAVADPOUR et al., 1996). A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado. Para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 com valores de (16 µg/mL) para EC27 e MRSA. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C utilizando para a leitura o corante resazurina.

Teste de Modulação: Para avaliar atividade moduladora da ação de antibióticos, a solução e as drogas testes foram misturadas em caldo BHI 10% em concentrações subinibitórias, preparadas com água destilada estéril em concentrações de 1024 µg/ml e volumes de 100 µl diluídas seriadamente 1:2. Na placa de microdiluição, cada poço conteve 100 µl de um preparado de caldo BHI 10% (150 µl do inóculo) e a solução na concentração determinada

pelo CIM/8 totalizando um conteúdo de 1,5 ml. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h.

Resultados

A prospecção fitoquímica permitiu verificar a presença de compostos fenólicos, flavonóides e taninos concernentes ao EHFCC e EHFCC-FM (tabela 1), destituindo-se especificamente apenas algumas subclasses desses metabólitos. Em ambos os extratos analisados notou-se a ausência de alcalóides. Quatro compostos foram identificados por cromatografia de alta eficiência, tendo como majoritários rutina com percentual de 6.81% para EHFCC e ácido clorogênico percentualmente correspondendo a 5.68% em EHFCC-FM (tabela 2).

Na avaliação da atividade antibacteriana do extrato hidroetanólico e fração metanólica das folhas de *C. coriaceum* Wittm., respectivamente EHFCC e EHFCC-FM para as cepas citadas anteriormente, foi determinada concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) ≥ 1024 , evidenciando que o extrato e a fração não possuem ação antibacteriana significativa contra as cepas testadas.

Apesar da ineficácia diante concentração inibitória mínima, o EHFCC e EHFCC-FM detiveram efeito potencializador quando na presença de antibióticos aminoglicosídeos. Combinado à amicacina e gentamicina, o EHFCC apresentou sinergismo contra *S. aureus* 358, com percentuais respectivos, 50% e 75% e contra *E. coli* 27, demonstrou efeito sinérgico apenas combinado à neomicina com percentual de inibição de 75% (valores expressos na tabela 3).

Para EHFCC-FM foi observado efeito sinérgico quando em combinação com amicacina contra *S.aureus* 358 em 87,5% de inibição; já contra *E. coli* 27 o sinergismo se deu na presença de amicacina (87,5%) e neomicina (75%) (valores expressos na tabela 4).

Evidencia-se dessa forma o efeito modulador sinérgico para o extrato e fração das folhas de pequi (EHFCC e EHFCC-FM) em junção a determinados antibióticos aminoglicosídeos.

Referente à ação antifúngica, pode-se observar na concentração inibitória mínima uma CIM ≥ 1024 , o que significa que o EHFCC e EHFCC-FM não demonstram atividade

significativa contra as cepas fungicas testadas. Bem como na análise modulatória não se pode destacar efeito sinérgico ou antagônico, em ambas as cepas e extratos testados a concentração determinada foi ≥ 1024 .

Discussão

Extratos são misturas complexas, logo, o uso de tais substâncias como agentes antimicrobianos expõem baixo risco de aumento da resistência microbiana a sua ação, dificultando assim a adaptabilidade microbiana (DAFERERA et al., 2003). Produtos naturais de origem vegetal podem alterar o efeito de antibióticos, seja aumentando a sua atividade ou revertendo à resistência (COUTINHO et al., 2008a).

Nesse aspecto, a caracterização fitoquímica está de acordo com a literatura tratada a respeito dos componentes químicos encontrados na família Caryocaraceae, foi detectada a presença de taninos e flavonóides nas folhas de *Caryocar brasiliense* (RIBEIRO et al., 2009). Taninos são polifenóis de alto peso molecular, solúveis em água (SANTOS et al., 2007), atuam na captação de radicais livres, além de promoverem ação antimicrobiana (MONTEIRO et al., 2005a). Sua capacidade de complexação junto a proteínas e seu poder em sequestrar íons metálicos, especialmente o ferro, resulta em sua ação contra o desenvolvimento de microorganismos (SCALBERT 1991); por este mecanismo de ação, é atribuído a essa classe inibir diretamente os processos microbianos (SELVAKUMAR et al., 2007). Taninos condensados ligam às paredes celulares de bactérias ruminais, impedindo o crescimento e atividade de protease (ELIOZONDO et al., 2010).

Já os flavonóides constituem uma classe importante de polifenóis (ZUANAZZI et al., 2007), são sintetizados por plantas em resposta à infecção microbiana (DIXON et al., 1983). Tais metabólitos têm atraído muito interesse recentemente, devido ação testada *in vitro* e *in vivo*, como, antioxidantes, varredores de radicais livres e quelantes de metal, incluindo anti-inflamatórios (GUARDIAN et al. 2001), antialérgico, anticarcinogênicas, anti-hipertensivos, efeito antiartrite e antimicrobianos (HAN 2009). VAQUERO et al (2007) demonstra o efeito antimicrobiano de sete compostos fenólicos puros: quatro ácidos fenólicos, gálico, vanílico, flavonóides protocatecuico e caféico e três, rutina, catequina e quercetina contra o *S.*

marcescens, *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Flavobacterium sp.* O estudo mostra que a *E. coli* ATCC 25922 foi mais resistente que as outras bactérias e glicosídeo flavonóide, rutina foi o menos eficaz; nenhum efeito inibitório foi observado contra as cepas de *S. aureus* em sua presença. Demonstrou ainda que a quercetina foi o único dos compostos fenólicos a exibir efeito antibacteriano contra todas as bactérias testadas.

Rutina e quercetina estão presentes na composição de EHFCC e EHFCC-FM, sendo ácido clorogênico predominante na fração. A rutina, por ser um flavonóide possui biossíntese iniciada a partir da combinação das duas principais vias dos compostos fenólicos (shiquimato e acetato); apresenta um dissacarídeo e exerce importante papel na absorção de compostos lipofílicos (PEDRIALI 2005). Tem se destacado por apresentar várias atividades, dentre as quais anti-candida (HAN 2009), anticarcinogênica (MACHADO 2006) e antiinflamatória (GUARDIA et al., 2001).

O ácido clorogênico é um compostos fenólico derivado do ácido cafeico (MARTINS et al., 2009), família esta em que existem controvérsias a respeito da possibilidade de ação antimicrobiana, apesar de haver relatos de atividade em avaliação de difusão em ágar (ALMEIDA 2007).

SINGH et al (2008) mostrou a atividade antimicrobiana de rutina contra toda a flora bacteriana patogênica do trato gastrointestinal, comparada com a eritromicina para verificar se o princípio ativo envolvido é rutina ou algum outro componente. Os estudos mostraram que a rutina exibiu potente atividade contra *B. cereus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* com os valores de CIM de 0,03 mg / ml. No estudo do COBAS et al (2007) envolvendo atividade antimicrobiana de *Cydonia oblonga* Miller e padrões fenólicos puro, como ácido clorogênico, rutina, quercetina, observou-se que a atividade antimicrobiana foi superior contra *S. aureus* e *P. aeruginosa*, encontrados mais suscetíveis a polifenóis do que *E. coli* e *C. albicans*. As substâncias fenólicas puras padrão neste trabalho mostraram baixa atividade antibacteriana, quando utilizado nos testes de difusão em concentrações normalmente presentes nos extratos de marmelo. Parece que os polifenóis, especialmente o ácido clorogênico, agem em sinergia com outros componentes dos extratos para expor sua total atividade antimicrobiana que explicam o efeito sinérgico para a fração metanólica presente.

Paula Júnior, 2004 em avaliação sobre folhas da espécie *C. brasiliensis*, observou ação antibacteriana das folhas do pequizeiro contra *S. aureus*, *E. coli*, entre outras, através do método de difusão em ágar, assim como detectou influência sobre o crescimento de fungos,

entre outros *Candida albicans*. O fator determinante da não correlação entre tais dados pode ser atribuído especialmente no sentido das diferentes concentrações estabelecidas pelos diferentes métodos de avaliação antimicrobiana, tendo em vista que o método utilizado no presente trabalho trata-se de microtitulação, ou seja, em escala de grandezas micro.

A ação potencializadora dos extratos avaliados nesse trabalho contra cepas bacterianas relacionadas remete alusão à polaridade dos fármacos aminoglicosídeos, assim como devido à presença das classes de metabólitos já esclarecidas. Em suma nossos dados mostram que o principal constituinte do extrato é a rutina e da fração o ácido clorogênico. Baseado na literatura podemos sugerir, que possivelmente esses dois compostos estejam diretamente relacionados aos efeitos modulatórios sinérgicos combinados à aminoglicosídeos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 114–140, 2007.

ALMEIDA, A. A. P., **Atividade antimicrobiana de extratos e de compostos fenólicos e nitrogenados do café: avaliação *in vitro* e em modelo alimentar**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Farmácia da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2007.

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

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; LIMA, E. O.; FALCÃO-SILVA, V. S.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P. Enhancement of the Antibiotic Activity against a Multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and Chlorpromazine. **Chemotherapy**, v. 54, n. 4, p. 328-330, 2008a.

COUTINHO, H.D.M.; CORDEIRO, L.N.; BRINGEL, K.P. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria isolated from the population of Juazeiro do Norte-Ceara. **Revista Brasileira Ciência e Saúde**, v. 9, p.127-138, 2005.

DAFERERA, D.J., ZIOGAS, B.N. & POLISSIOU, M.G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44.

DE OLIVEIRA, M.E.B.; GUERRA, N.B.; MAIA, A.D.N.; ALVES, R.E.; MATOS, N.M.D.; SAMPAIO, F.G.M.; LOPES, M.M.T. Chemical and physical–chemical characteristics in pequi from the chapada do Araripe, Ceara, Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, p. 114–125, 2010.

DIXON, R.A., DEY, P.M. & LAMB, C.J. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 55, p. 1–69, 1983.

ELIZONDO, A. M.; MERCADO, E. C.; RABINOVITZ, BETTINA C.; FERNANDEZ-MIYAKAWA, M. E. Effect of tannins on the in vitro growth of *Clostridium perfringens*. **Veterinary Microbiology**, v. 145, p. 308-314, 2010.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. Q.; PELZER, L. E., Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hiperidin on adjuvant arthritis in rat. **II Pharmacology**, v. 56, p. 683-687. 2001.

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

HAN, Y., Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 207-211, 2009.

IZZO, A. A.; ERNST, E., Interactions Between Herbal Medicines and Prescribed Drugs: An Updated Systematic Review, **Drugs**, v. 69, n.3, p. 1777-1798, 2009.

JANA, S.; DEB, J.K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Apply Microbiology Biotechnology**, v. 70, p.140-150, 2006.

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 Medical Chemistry**, v. 39, p. 3107-3113, 1996.

KEITH, C.T.; BORISY, A.A.; STOCKWELL, B.R. Multicomponent therapeutics for networked systems. **Nature Revista Drug Discovery**, v. 4, p. 71-78, 2005.

LU, Y.; ZHAO, Y.P.; WANG, Z.C.; CHEN, S.Y.; FU, C.X. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Actinidia macrosperma* from China. **Nat Prod Res**, v. 21, p. 227-233, 2007.

LULLMANN, H; MOHR, K; *et al.* **Farmacologia texto e atlas**. 5ª edição. Porto Alegre: Ed. Artmed. 2008. Tradução de: Augusto Langeloh, *et al.*

MACHADO, H., **Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich "in vivo"**. 2006. 125f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, 2005.

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

MARQUES, M. C. S. **Estudo fitoquímico e biológico dos extratos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2001, 91 p. Dissertação (Mestrado). Lavras, 2001.

MARTINS, M. B. G., GRAFF, R. de R., CAVALHEIRO, A. J., RODRIGUES, S. D. Caracterização anatômica, química e antibacteriana de folhas de *Brunfelsia uniflora* (manacá) presentes na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p 106-114, 2009.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P. e ARAUJO, E. L. Tannins: from chemistry to ecology. **Química nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005a.

NCCLS. National committee for clinical laboratory standards. Performance standards of antimicrobial disk susceptibility test. *Atlanta, USA*, v. 8, p. 2-8, 2003.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. R.; MANCA DE NADRA, M. C. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**. p. 93–101, 2007.

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

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F.H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C.M.T.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leave hydroethanolic extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16, p.625-630, 2006.

PEDRIALI, C. A., **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de *caryocar brasiliense* camb., *caryocaraceae***. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

PIETRO, E.; VARALDO. Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic. **Journal of antibacterial chemotherapy**, v. 50, p. 1-4, 2002.

RIBEIRO, D. S., FERREIRA, A. de A. Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico de folhas de *Caryocar brasiliense* CAMBESS. **III Fórum gestão/pesquisa/ensino/extensão**. 2009.

SANTOS, S. C. da e MELLO, J. C. P. Taninos. In Coordenação: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Editorada UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, Great Britain, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SELVAKUMAR, G.; SAHA, S.; KUNDU, S. Inhibitory activity of pine needle tannin extracts on some agriculturally resourceful microbes. **Indian Journal of Microbiology**, v.47, p. 267–270, 2007.

SINGH, M.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S.; KHARE, P. B. Antimicrobial Flavonoid Rutin from *Pteris Vittata* L. Against Pathogenic Gastrointestinal Microflora. **American Fern Journal**, p. 98-103, 2008.

SOUSA, E. O., SILVA, N. F., RODRIGUES, F. F. G., CAMPOS, A. R., LIMA, S. G., COSTA, J. G. M. Chemical composition and resistance-modifying effect of the essential oil of *Lantana camara* **Linn Pharmacognosy**. v. 6, n. 22, p. 79–82, 2010.

ZUANAZZI, J. A. S e MONTANHA, J. A. Flavonóides. In Coordenação: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Editorada UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

Tabela 1: Prospecção fitoquímica: Classes de metabólitos secundários.

Metabólitos secundários	Presença/ausência		
	EHFCC	EHFCC-FM	
Compostos Fenólicos	+	+	
Flavonóides	Flavonas	+	+
	flavonóis	+	+
	xantonas	+	+
	chalconas e auronas	-	-
	flavononóis	-	+
	antocianinas	-	-
	antocianidinas	-	-
	leucoantocianidinas	-	-
	catequinas	-	-
flavononas	-	+	
Taninos pirogálicos	+	-	
Taninos hidrolizáveis	-	+	
Alcalóides	-	-	

(+) : Presença; (-): Ausência.

Tabela 2: Composição das folhas de *Caryocar coriaceum*.

Compostos	EHFCC		EHFCC-FM	
	mg/g	Percentual (%)	mg/g	Percentual (%)
Ácido gálico	19.0 ± 0.15	1.90	11.2 ± 0.34	1.12
Ácido clorogênico	31.4 ± 0.26	3.14	56.8 ± 0.16	5.68
Ácido caféico	18.7 ± 1.02	1.87	7.5 ± 0.09	0.75
Rutina	68.1 ± 0.04	6.81	32.5 ± 0.05	3.25
Quercetina	26.9 ± 0.17	2.69	18.5 ± 0.03	1.85

Valores expressos em ± E.P.M.

Tabela 3: Avaliação da atividade moduladora do EHFCC bruto.

	Atividade moduladora ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>S. aureus</i> 358				<i>E. coli</i> 27			
	AMI	KAN	GEN	NEO	AMI	KAN	GEN	NEO
EHFCC	312,5	1250	4,88	312,5	2500	2500	19,53	156,25
C+	625	312,5	19,53	312,5	2500	2500	19,53	625
%EHFCC	50%	-300	75%	0	0	0	0	75%

C+: somente o antibiótico; * valores negativos: antagonismo; %: percentuais de inibição.

AMI: amicacina, KAN: kanamicina, GEN: gentamicina, NEO: neomicina.

Tabela 4: Avaliação da atividade moduladora da fração metanólica do pequi (EHFCC-FM).

	Atividade moduladora ($\mu\text{g/mL}$)							
	<i>S. aureus</i> 358				<i>E. coli</i> 27			
	AMI	KAN	GEN	NEO	AMI	KAN	GEN	NEO
EHFCC-FM	78,125	1250	19,53	312,5	312,5	2500	312,25	156,25
C+	625	312,5	19,53	312,5	2500	2500	19,53	625
%EHFCC-FM	87,5%	-300	0	0	87,5%	0	-1498,8	75%

C+: somente o antibiótico; * valores negativos: antagonismo; %: percentuais de inibição.

AMI: amicacina, KAN: kanamicina, GEN: gentamicina, NEO: neomicina.

6. CAPÍTULO II

**Atividade anti-edematogênica tópica e
antioxidante do extrato hidroalcoólico e fração
metanólica das folhas de *Caryocar coriaceum*
Wittm. (Caryocaraceae).**

Resumo

Diversas as patologias que caracterizam um processo inflamatório com ou sem um componente imunológico. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) é uma planta arbórea, preservada em ambiente de Cerrado, nativa oleífera da Chapada do Araripe (sul do Ceará, região do Cariri) conhecida popularmente por pequizeiro. Por não haver relatos na literatura a respeito das atividades biológicas das folhas desse vegetal, esse artigo traz a possibilidade de destacar um possível efeito antiinflamatório tópico do extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas do pequizeiro, a partir de modelos *in vivo* e sugerir vias de mecanismos pelo qual essa atividade esteja se desenvolvendo, bem como visa diagnosticar ação antioxidante dessa planta correlacionando as bases efetivas de ambos os testes. Foi realizado teste de edema de orelha induzido por agentes flogísticos diferentes (óleo de croton, ácido araquidônico, fenol e histamina); e para verificação de ação antioxidante realizou-se atividade sequestrante de DPPH. O EHFCC e o EHFCC-FM demonstraram atividade anti-edematogênica tópica, variando em mecanismo de agente flogístico, sugerindo efeito anti-inflamatório. Em relação a atividade antioxidante, apresentou CE_{50} significativamente inferior a 500 $\mu\text{g/mL}$.

Atividade anti-inflamatória tópica e antioxidante do extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae).

Mariana Késsia Andrade Araruna¹, Gerlânia de Oliveira Leite¹, Rogério de Aquino Saraiva³, Aline A. Boligon³, José Galberto Martins da Costa², Margareth L. Athaide³, João Batista Teixeira da Rocha³, Irwin Rose Alencar de Menezes¹

1 Universidade Regional do Cariri, Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular, 63105-000 Crato, CE, Brasil.

2 Universidade Regional do Cariri, Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular, Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, 63105-000 Crato, CE, Brasil.

3 Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Departamento de Química, Laboratório de Bioquímica Toxicológica, 57900-000 Santa Maria, RS, Brasil.

Introdução

A pele apresenta-se constantemente sujeita a estímulos externos como patógenos, agentes mecânicos e químicos e resposta auto-imune. Tais estímulos podem desencadear uma resposta inflamatória, cuja finalidade é eliminar o agente invasor, a fim de evitar sua disseminação entre os órgãos, promovendo reparo tecidual e restabelecimento da função protetora da pele (FIRESTEIN, 2004). Esse processo é iniciado através de uma cascata de eventos caracterizada pela ativação coordenada de vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores pró e antiinflamatórios, ambos com importantes funções no processo (LAWRENCE e GILROY, 2007).

São diversas as patologias que caracterizam um processo inflamatório com ou sem um componente imunológico. Mesmo pertencendo a um grupo similar, a sintomatologia, bem como os mecanismos envolvidos na patogênese são divergentes; sendo assim o perfil de estudo sobre patologias cutâneas não inferem o estudo de doenças com o mesmo perfil ou mesma forma de tratamento (BRUNTON et al., 2006).

Caryocar coriaceum Wittm. (Caryocaraceae) é uma planta arbórea, preservada em ambiente de Cerrado, nativa oleífera da Chapada do Araripe, região situada no Nordeste brasileiro (sul do Ceará, região do Cariri) conhecida popularmente por pequizeiro (COSTA, ARAÚJO e LIMA-VERDE, 2004; OLIVEIRA *et al*, 2004; LORENZI, 1992). O óleo fixo extraído da polpa do fruto (pequi) tem ação anti-inflamatória tópica e gastroprotetora comprovada experimentalmente *in vivo* (SARAIVA et al., 2010; QUIRINO, 2009). Já suas folhas são popularmente utilizadas para fins medicinais na forma de decocto em combate a gripes, resfriados e disfunções hormonais (AGRA et al., 2007).

Na literatura científica não há relatos a respeito de atividade biológica para as folhas do *C. coriaceum*. Dessa forma esse artigo traz a possibilidade de destacar um possível efeito antiinflamatório tópico do extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas do pequizeiro, a partir de modelo *in vivo* e sugerir vias de mecanismos pelo qual essa atividade esteja se desenvolvendo, bem como visa diagnosticar ação antioxidante dessa planta correlacionando as bases efetivas de ambos os testes.

Materiais e Métodos

Material botânico

As folhas de *cariocar coriaceum* Wittm. foram coletadas em área de Cerrado na Chapada do Araripe, Crato, Estado Ceará, Brasil (7°21_53,1” S; 66 W39°28_42,6” W) em abril de 2010. A espécie foi identificada pela Prof. Dra. Lígia Queiroz Matias e catalogado em exsiccata no herbário indexado Prisco Bezerra, da Universidade Federal do Ceará, com número de registro 44523.

Reagentes químicos

O óleo de croton, o ácido araquidônico, o fenol, a histamina e a indometacina foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA). Dexametasona (Decadron ®) foi comprado (Brasil). O cloridrato de Cetamina e cloridrato de xilazina foram adquiridos da Syntec (Brasil). Acetona, etanol e metanol foram adquiridos da Dinâmica (Brasil).

Animais

Camundongos Swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos, com peso variando entre 25-35g, mantidos em caixas de propileno, sob condições controladas em temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de claro-escuro de 12h, recebendo água e ração (Labina, Purina, Brasil) *ad libitum*. O projeto de dissertação devidamente enviado com aprovação pelo comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade de Fortaleza (Brasil), portando número de registro 10-020. Estando de acordo com as normas de Bioética reconhecidas pela lei: 11.794/08, a qual regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos (GOLDIM et al., 2008).

Obtenção do Extrato e fracionamento

O extrato hidroalcoólico foi preparado no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da URCA, sob coordenação do Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa. A extração realizada a frio em concentração 1:1 foi embebida por solvente etanol P.A acrescido de água destilada por um período de 72h. Após esse período, a mistura líquida obtida foi filtrada e concentrada em aparelho rota evaporador (27 – 30rpm) em temperatura 45°C para destilação do solvente. Posteriormente foi levado ao banho-maria, congelado e liofilizado. Para obtenção da fração, utilizaram-se quatro solventes (em escala de polaridade), tendo como método a filtração a vácuo, utilizando funil de Buchinner e kitassato. O melhor rendimento foi dado pelo metanol.

Quantificação química por HPLC

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob condições de gradiente usando coluna C₁₈. A fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético e metanol, e o gradiente de composição: 5% metanol por 2 min, 25% metanol até 10 min, 40, 50, 60, 70 e 80% metanol a cada 10 min. Banco de soluções de referências padrões foram preparados em HPLC de fase móvel em um intervalo de concentração de 0,050-0,250 mg/ml para quercetina e rutina, e 0,020-0,200 mg/ml para os ácidos gálico, clorogênico e caféico.

Edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de croton

Os animais (camundongos *Swiss*; n = 7 / grupo) tiveram suas orelhas direitas pré-tratadas topicamente com salina 0,9%, dexametasona 4mg/mL e concentrações 2 e 1mg/orelha de EHFCC ou EHFCC-FM (aplicações de 20µL: 10µL face externa e 10µL face interna das orelhas), esperado 15 minutos para absorção. Após 1h aplicou-se 20µL do agente flogístico óleo de cróton 5% (v/v) em acetona nas orelhas direitas e 20µL do veículo acetona nas orelhas esquerdas. Decorridas 6h, os animais foram submetidos ao sacrifício para posterior retirada das orelhas, cortadas em discos de 6 mm de diâmetro (com perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (TUBARO, 1985).

Edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de croton

Para realização desse estudo crônico, os animais (camundongos *Swiss*; n = 7 / grupo) foram submetidos a aplicação tópica de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona nas orelhas direitas e 20 μ L do veículo acetona nas orelhas esquerdas em dias alternados durante nove dias. No quinto dia de experimentação, os animais receberam tratamento (via tópica-20 μ L) com salina 0,9%, dexametasona 4mg/mL e EHFCC ou EHFCC-FM nas concentrações 2 e 1mg/orelha completando o ciclo de nove dias de experimentação. Ambas as orelhas tinham mensurações diárias com uso de paquímetro digital durante todo o período do teste. Após os nove dias, os animais foram sacrificados e suas orelhas retiradas em discos de 6 mm de diâmetro (com perfurador de couro metálico) e pesadas em balança analítica (STANLEY *et al.*, 1991).

Edema de orelha induzido por ácido araquidônico

Para avaliação da atividade tópica neste modelo, os animais (camundongos *Swiss*; n = 7 / grupo) tiveram suas orelhas direitas pré-tratadas com 20 μ L de solução salina, indometacina 100mg/mL, EHFCC ou EHFCC-FM nas concentrações 2 e 1mg/orelha, esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 μ L de ácido araquidônico 0,1 mg/ μ L em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 μ L do veículo acetona foi aplicado na orelha esquerda. Após 1h deu-se o sacrifício e discos de 6mm de diâmetro foram obtidos das orelhas para análise conforme supracitado no itens anteriores (YOUNG *et al*, 1984; CRUMMEY *et al*, 1987).

Edema de orelha induzido por fenol

Nessa avaliação, as orelhas direitas de camundongos *Swiss* (n = 7 / grupo) foram pré-tratadas, topicamente, com 20 μ L de solução salina, dexametasona 4 mg/mL, EHFCC ou EHFCC-FM 2 e 1mg/orelha, esperando 15 minutos para absorção. Em seguida, 20 μ L de fenol 10% (v/v) em acetona foi aplicado na orelha direita e 20 μ L do veículo acetona foi aplicado na orelha

esquerda. Após 1 hora, os animais foram sacrificados, obtendo-se discos de 6 mm de diâmetro para análise do edema conforme item acima (GÁBOR, 2000).

Edema de orelha induzido por histamina

Inicialmente, cada animal (n = 7 / grupo) foi anestesiado com cloridrato de cetamina 0,02 mL (i.p.) e cloridrato de xilazina 0,01 mL (i.p.). Em seguida, receberam pré-tratamento tópico com 20µL de salina, dexametasona 4mg/mL, EHFCC ou EHFCC-FM 2 e 1mg/orelha. Após 30 minutos, foi administrado um volume de 5µL de uma solução de histamina (100 mg/mL de salina), intradermicamente, na região ventral da orelha direita dos camundongos com o auxílio de uma agulha hipodérmica 29 G, enquanto que a orelha esquerda recebeu o mesmo volume de salina, também intradermicamente. Após 2 horas, os animais foram sacrificados para posterior avaliação do edema a partir das massas dos discos obtidos, conforme item acima (BRAND *et al*, 2002).

Atividade seqüestradora de radicais livres DPPH

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada através de sua habilidade em extinguir o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), de acordo com CHOI et al (2002), com pequenas modificações. EHFCC e EHFCC-FM em concentrações que variam de 6,25-50 µg / mL diluído em veículo etanol foram incubadas na ausência (em branco) ou presença de 0,3 mM de DPPH solução de etanol no escuro e em temperatura ambiente. Ácido L-ascórbico (em concentrações que variam 1,1-5,5 µg / mL) foi utilizado como controle positivo. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em 518 nm. Limpeza ou a capacidade inibitória em porcentagem (% IC) foi calculado através da seguinte equação:

$$IC\% = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 / Abs_{control}]$$

onde $Abs_{amostra}$ é a absorbância obtida na presença de concentrações diferentes de EHFCC ou EHFCC-FM na presença de DPPH solução de etanol, Abs_{branco} é a absorbância obtida na presença de concentrações diferentes de EHFCC ou EHFCC-FM, na ausência de DPPH solução de etanol (em branco) e $Abs_{control}$ que é a obtida na ausência de extratos e na presença de DPPH solução de etanol sem qualquer extrato ou controle positivo. A capacidade de seqüestrar radicais livres (FRSC) de EHFCC e EHFCC-FM foi calculada como seus valores IC_{50} (a concentração necessária para inibir 50% na formação de radicais), usando o método de DIXON E WEBB. Os testes foram realizados em quadruplicata.

Análise estatística

Os resultados são expressos em média \pm erro padrão das médias (E.P.M). Os dados numéricos são submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Student-Newman Keuls, sendo aceitos como diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

Resultados

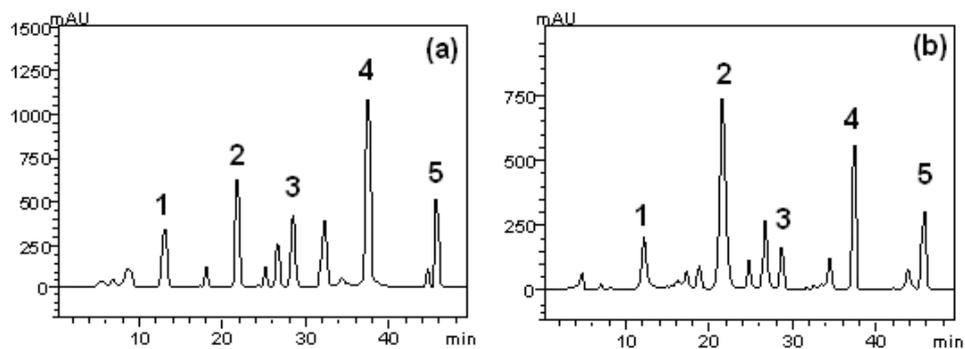


Gráfico 1: Perfil cromatográfico de alta eficiência desempenhado por a) EHFCC e b) EHFCC-FM para compostos fenólicos e flavonóides. Ácido gálico (pico 1), ácido clorogênico (pico 2), ácido caféico (pico 3), rutina (pico 4) e quercetina (pico 5).

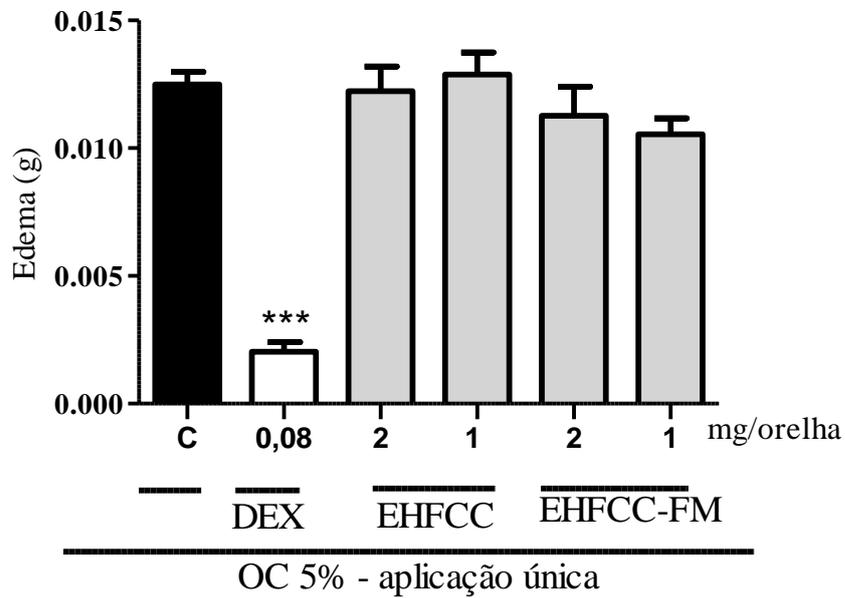


Gráfico 2: Efeito do tratamento tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência da aplicação única de óleo de croton após 6h. O edema foi analisado através do cálculo da massa (peso em gramas) das orelhas (discos de 6mm de diâmetro), mensuradas em balança analítica. As médias E.P.M foram comparadas em função do grupo controle negativo (C), consideradas significativamente divergentes para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$). Análise ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

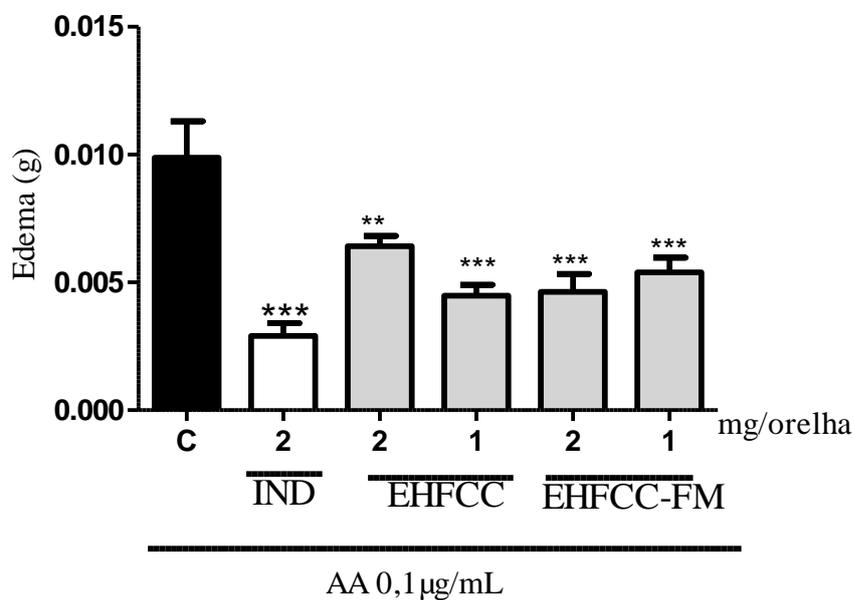


Gráfico 3: Efeito do tratamento tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência de ácido araquidônico após 1h. O edema foi analisado através do cálculo da massa (peso em gramas) das orelhas (discos de 6mm de diâmetro), mensuradas em balança analítica. As médias E.P.M foram comparadas em função do grupo controle negativo (C), consideradas significativamente divergentes para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$). Análise ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

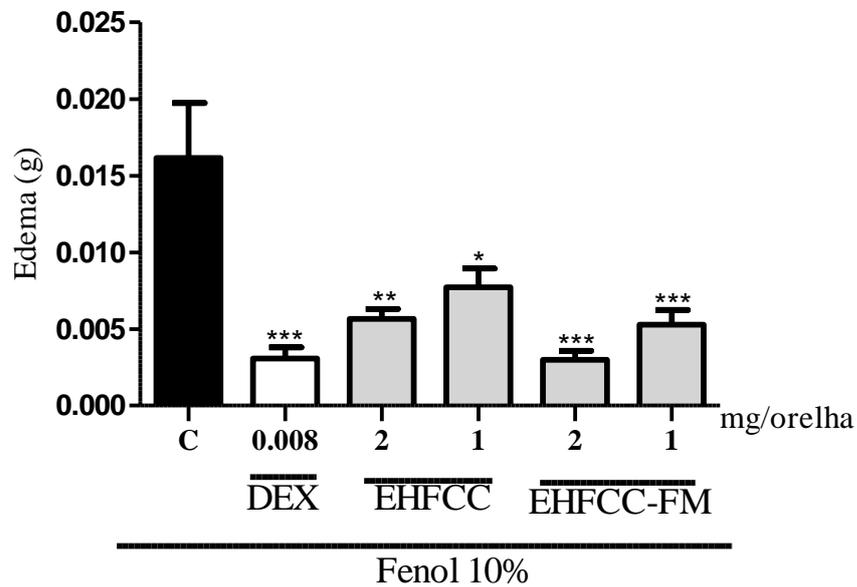


Gráfico 4: Efeito do tratamento tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência de fenol após 1h. O edema foi analisado através do cálculo da massa (peso em gramas) das orelhas (discos de 6mm de diâmetro), mensuradas em balança analítica. As médias E.P.M foram comparadas em função do grupo controle negativo (C), consideradas significativamente divergentes para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$). Análise ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

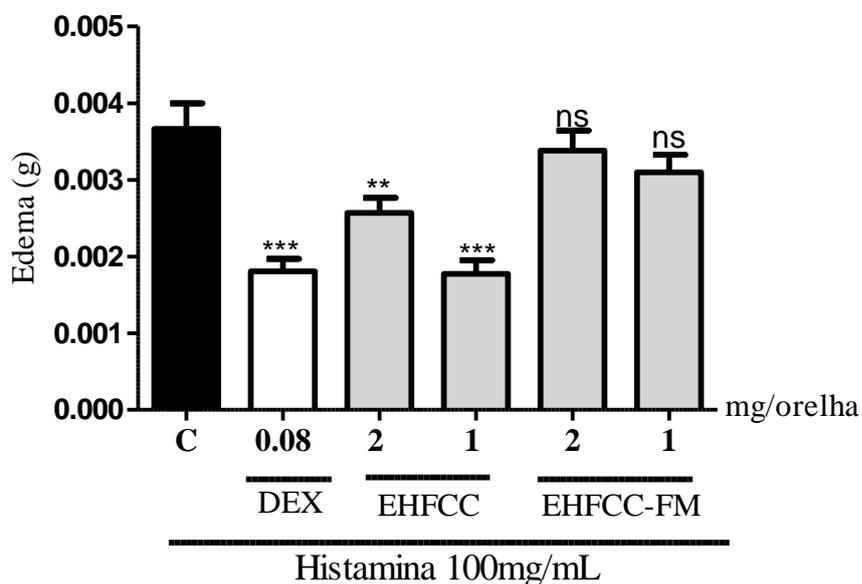


Gráfico 5: Efeito do tratamento tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência de histamina após 2h. O edema foi analisado através do cálculo da massa (peso em gramas) das orelhas (discos de 6mm de diâmetro), mensuradas em balança analítica. As médias E.P.M foram comparadas em função do grupo controle negativo (C), consideradas significativamente divergentes para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$). Análise ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

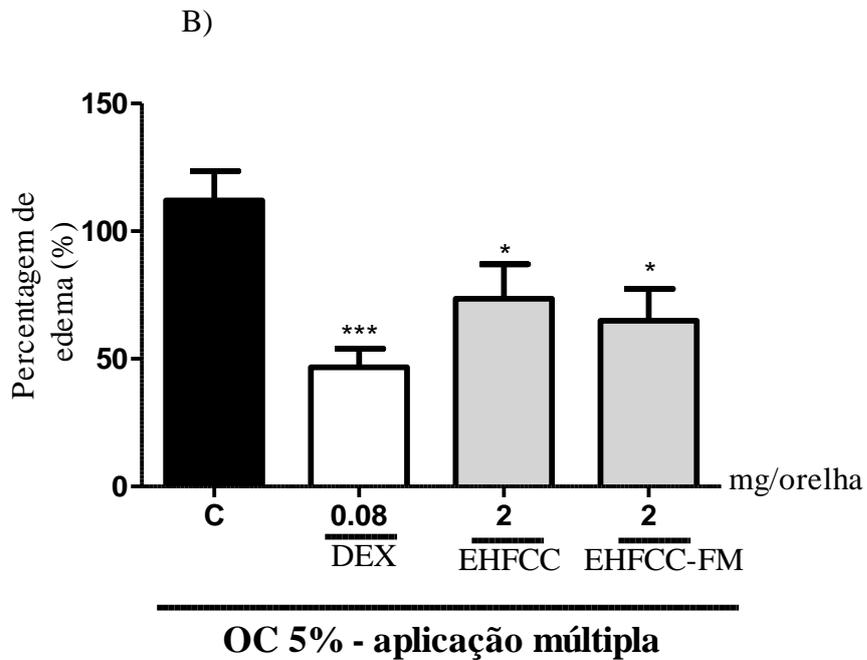
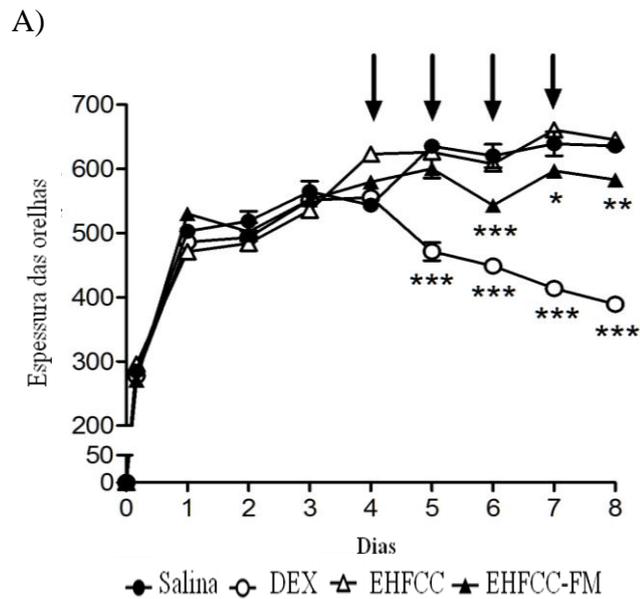


Gráfico 6: Efeito do tratamento tópico de EHFCC e EHFCC-FM sobre influência da aplicação múltipla de óleo de croton após 9 dias. A) Gráfico referente a espessura das orelhas dos camundongos sobre aplicação múltipla em dias alternados de óleo de croton. B) Percentual médio referente a massa final (peso em gramas) das orelhas de camundongos, calculada a partir de pesagem em balança analítica. As médias E.P.M foram comparadas em função do grupo controle negativo (C), consideradas significativamente divergentes para $p < 0,05$ (* $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$). Análise ANOVA seguida do Teste de Student-Newman-Keuls.

Tabela 5: Efeito antioxidante de EHFCC e EHFCC-FM em função de radicais livres (DPPH) *in vitro*.

CONTROLE NEGATIVO 0,8535 ± 0,012

	Concentrações µg/mL	EHFCC	EHFC-FM	Concentrações µg/mL (AAs)	Ácido ascórbico (AAs)
Controle negativo	6,25	0,556±0,122**	0,53025±0,079**	1,1	0,4595±0,033***
	12,5	0,30675±0,142***	0,20425±0,036***	2,2	0,09225±0,007***
	25	0,33725±0,071***	0,11125±0,043***	4,4	0,1285±0,0227***
	50	0,0635±0,010***	0,0645±0,0185***	5,5	0,04275±0,010***

P < 0,01 e *P < 0,001 comparados ao controle, ANOVA one-way followed by Student-Newman-Keuls test.

Resultados e Discussão

O modelo de inflamação cutânea, edema de orelha, propicia o estudo “*in vivo*” do caráter antiedematogênico de substâncias para finalidade de uso tópico. Além de definir objetivamente propriedades terapêuticas, é um método importante por possibilitar o estudo das respostas inflamatórias, ao sugerir local de ação e absorção da substância avaliada, devido à aplicabilidade no foco do processo inflamatório (VANE, 2000). A partir dessa justificativa, se relaciona os variados agentes flogísticos (óleo de croton, AA, histamina e fenol) utilizados para fins da pesquisa antiinflamatória, pois cada um deles retém propriedades específicas que caracterizarão o possível mecanismo efetor da substância (GÁBOR, 2000).

O óleo de croton extraído da planta *croton tiglium*, tem como princípio irritante majoritário o TPA (13-acetato de 12 –o-tetracanoilforbol) (LAPA, 2003). O modelo de edema induzido por aplicação única desse agente consiste na triagem de ação de compostos atuantes na fase aguda do processo inflamatório, envolvendo além da formação de edema, resultando em vasodilatação e intensa infiltração leucocitária, uma alteração do crescimento e diferenciação dos queratinócitos, identificando típica resposta hiperproliferativa (GABOR, 2000). O mecanismo pelo qual o TPA exerce seu efeito decorre da ativação da proteína quinase C (PKC) que ativa sequencialmente outras enzimas como as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e a fosfolipase A₂ (PLA₂) que induz a liberação de PAF e AA, as quais desencadeiam sucessivamente eicosanóides inflamatórios via COX e LOX (WANG et al., 2001; MURAKAWA et al, 2006). Estudos recentes apontam que o TPA também ativa vias de sinalização intracelulares dependentes do óxido nítrico sintetase induzível (iNOS), o qual tem um papel fundamental no controle da resposta inflamatória na pele pela produção de NO (MEDEIROS et al., 2009).

No modelo de aplicações múltiplas de óleo de croton, caracterizando uma inflamação crônica, busca-se demonstrar ação de fármacos que influenciam a produção de leucotrienos (STANLEY et al., 1991); portanto corticosteróides e inibidores da LOX são eficazes nesse modelo, enquanto que os inibidores da COX e anti-histamínicos demonstram pouco ou nenhum efeito (GREEN e SHUSTER, 1987). Como verificado (gráfico 2) o EHFCC e EHFCC-FM não demonstraram efeito inibitório em aplicação única de OC, já no tratamento múltiplo em dias alternados, observou-se redução significativa para EHFCC-FM, permitindo

sugerir ação da enzima lipoxigenase ou vias dependentes de óxido nítrico no processo inflamatório, tendo em vista a significância inibitória apresentada pelo o extrato e fração, quando avaliado o efeito edematogênico a partir mensuração final das massas das orelhas (tabela 5), ou seja, a ação do produto natural quando instalado o processo inflamatório crônico (gráfico 6 A e B).

O edema induzido por AA é um modelo preferencial de identificação de inibidores da Lipoxigenase (RECIO et al., 2000). Entretanto, há metabólitos do AA que promovem degranulação de mastócitos, liberando histamina, concluindo que esse modelo não é específico para compostos que inibem exclusivamente a COX e/ou LOX, pois devido a histamina contribuir na formação do edema, agentes como antagonistas da histamina e antioxidantes também reduzem o edema induzido por AA (CRUMMEY, 1987; BLASZÓ e GABOR, 1995). Dessa forma, os dados (gráfico 3) mostram redução edematogênica significativa em todas as concentrações testadas para o extrato e fração. As significâncias dos dados firmam a hipótese de redução edematogênica por vias de mecanismos antioxidantes, tendo em vista a liberação espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico induzível por vias independentes do AA. Além de antagonistas da histamina e antioxidantes serem capazes de reduzir o edema induzido por AA (BLASZÓ e GABOR, 1995).

O extrato e a fração metanólica das folhas de *C. coriaceum*, tiveram um dos seus melhores resultados com o efeito em potencial exercido sobre a indução de edema de orelha pelo agente irritante fenol (gráfico 4), configurando similaridade estatística ao efeito da fração com a indução por AA; isso possibilita relatar a eficiência de tal produto natural mimetizando processos inflamatórios decorrentes da aplicação tópica de variadas substâncias irritativas sobre dermatite de contato (RAUH, 2008). A partir do contato com o fenol, os queratinócitos produzem mediadores químicos de exímia importância na irritação primária de contato, incluindo citocinas, tais como IL-1 α , TNF- α e IL-8 (LIM, et al., 2004). Um dos mecanismos sugeridos para atuação do fenol é desencadeada pela ruptura da membrana plasmática dos queratinócitos por efeito direto, resultando na liberação da IL-1 α pré-formada, além de outros mediadores inflamatórios como os metabólitos do AA e ROS, sendo estes dois últimos provenientes também do estresse oxidativo. Vale ressaltar que as citocinas pró-inflamatórias são produzidas por um mecanismo distinto das vias dependentes da PKC (WILMER et al., 1994; MURRAY et al., 2007), fato que permite confirmar sugestivamente a ação

desencadeada pelo extrato e sua fração sobre vias relacionadas mecanismos oxidantes antioxidantes, por considerando o estresse oxidativo.

A histamina é uma amina vasoativa liberada por mastócitos ativados pelas proteínas do sistema complemento C3a e C5a e por leucócitos ativados por IgE. São responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e ação vasodilatadora (RANG *et al.*, 2007; KINDT *et al.*, 2008), encontrando-se envolvida nas reações de hipersensibilidade imediata, devido sua ação rápida (BRAND *et al.*, 2002). O modelo de edema de orelha induzido por histamina demonstrou efeito significativo para EHFCC em ambas as concentrações (gráfico 5), atividade essa semelhante significativamente à apresentada pelo modelo induzido pelo AA; no entanto em se tratando de EHFCC-FM não apresentou nenhum efeito antiedematogênico significativo (gráfico 5). Tal ineficiência pode ser suposta devido à capacidade de compostos fenólicos, especialmente o ácido clorogênico, quelar-se com o ferro, cabendo ressaltar também que seu composto majoritário ácido clorogênico, possui mecanismo distinto de quelação comparado a flavonóides com a rutina (majoritário do EHFC) (ANDJELKOVIC' *et al.*, 2006). Estudos apontam que o ácido clorogênico pode ser útil no tratamento de doenças alérgicas, devido sua capacidade inibitória sobre o composto 48/80 ou complexo IgE-antigênico, o qual induz a liberação de mastócitos em processos alérgicos; sugerindo que o ácido clorogênico tende a apresentar resultados positivos no tratamento de patologias de pele (HUI-DI QIN, *et al.*, 2010; TRINH, *et al.*, 2009; ARIDOR *et al.*, 1990).

O perfil cromatográfico (gráfico 1) mostra o índice cromatográfico da presença dos compostos rutina e ácido clorogênico em amostras de EHFCC e EHFCC-FM de forma majoritária respectivamente. A partir dessa informação pode-se atribuir possivelmente o potencial antiinflamatório apresentado pelas folhas de *C. coriaceum* à presença de tais compostos nos extratos; ambos os extratos possuem rutina e ácido clorogênico em sua composição, alternando entre eles maior concentração, por isso é válido ressaltar tais componentes como base de efeito antiinflamatório. Recentes pesquisas *in vitro* avaliaram que a rutina apresenta atividade exercida na superfície ou camadas superficiais da pele, atuando assim de forma tópica em pele de *Crotalus durissus* (BABY, 2007; BABY *et al.*, 2008). O ácido clorogênico é o éster que mais apresenta estudos relacionados à sua bioatividade (UNHO *et al.*, 2005), é um dos compostos fenólicos mais encontrados em vegetais (HYNES e O'COINCEANAINN, 2004). Estudos apontam o ácido clorogênico como composto fenólico detentor de potencial antioxidante em frutas (TSAO *et al.*, 2005), bem como seu isômero 5-

ACQ (ácido 5-cafeoilquínico) com propriedades antiinflamatórias devido capacidade de inibição de processo inflamatório mediado por citocinas (KRAKAUER, 2002). Rutina e quercetina também possuem excelentes propriedades antioxidantes. Inibem a peroxidação lipídica e aumentam os sistemas antioxidantes endógenos, principalmente o da glutathiona (GSH), além disso a quercetina que é um produto da rutina, inibe a produção de óxido nítrico e a expressão da NOSi (RICE EVANS et al., 1995).

Radicais livres podem atacar proteínas, levando a diversas mudanças em seus aminoácidos, sua fragmentação, agregação e conseqüentemente diminuição de sua atividade biológica. Como o composto fenólico tem capacidade de quelar-se junto ao Cu^+ , este mecanismo seria promotor da ação antioxidante, visto que o íon Cu^+ é um importante catalisador da formação de radicais livres; fato comprovado em pesquisa ao demonstrar atividade antioxidante do ácido clorogênico ao proteger proteínas do ataque de radicais livres (KISS et al., 1989). Em análise de atividade antioxidante para EHFCC e EHFCC-FM, observou-se efetiva ação das folhas do pequiizeiro em todas as concentrações testadas (tabela 6), o que certamente infere alusão a natureza antioxidante de compostos fenólicos que tem sido referenciada em uma série de vegetais (BHAKTA e GANJEWALA 2009). Tal potencial antioxidante tem destaque estatístico de significância semelhante ao controle positivo ácido ascórbico. Essa ação estimula ainda mais a correlação de agentes ou vias de mecanismos antioxidantes, bem como estresse oxidativo junto ao efeito antiinflamatório também apresentado de forma significativa para as folhas do pequiizeiro. Segundo Campos et al., 2003, considera-se de potencial antioxidante uma amostra representada por $\text{CE}_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$. Ou seja, as amostras provenientes das folhas de *C. coriaceum*, demonstram ser detentoras de alto valor antioxidante com $\text{CE}_{50} = 11,90 \pm 3,883 \mu\text{g/mL}$ e $7,65 \pm 1,053 \mu\text{g/mL}$ para EHFCC e EHFCC-FM respectivamente (tabela 2), ficando acima da média requerida; além do fato que tais resultados são precursores em relatos de atividades biológicas representadas por extratos foliares da espécie *Caryocar coriaceum* Wittm.

6. Referências

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

ANDJELKOVIC', M.; CAMP, J. V.; MEULENAER, B. D.; DEPAEMELAERE, G.; SOCACIU, C.; VERLOO, M.; VERHE, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p.23-31, 2006.

ARIDOR M, TRAUB LM, SAGI-EISENBERG R. Exocytosis in mast cells by basic secretagogues: evidence for direct activation of GTP-binding proteins. **J Cell Biol.** v. 111, p. 909–17, 1990.

BABY, A. R. et al. Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.27, n.1, p.23-27, 2008.

BABY, A. R. **Avaliação in vitro da permeabilidade cutânea da rutina em emulsões cosméticas**. 2007. 144f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BHAKTA, D.; GANJEWALA, D. Effect of Leaf Positions on Total Phenolics, Flavonoids and Proantho-cyanidins Content and Antioxidant Activities in *Lantana Camara* (L). **Journal of Scientific Research**, v. 1, n. 2, p. 365-369, 2009.

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

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

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L.; **GOODMAN & GILMAN**: As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006.

CAMPOS, M.G.; WEBBY, R.F.; MARKHAM, K.R.; MITCHELL, K.A.; DA CUNHA, A.P. Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 742-745, 2003.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PAERK, S.H.; KIN, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 153:1161-1168. 2002.

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

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

DIXON, M.; WEBB, E.C. *Enzymes*, 2nd ed., Longmans, London, 950 pp. 1964.

FIRESTEIN, G.S. Mechanisms of inflammation and tissue repair. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. **Textbook of Medicine**, 22 ed., p. 227, 2004.

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

GOLDIM J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em Modelos Animais**. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/animrt.htm>>. Acesso em: 22 de maio de 2009. 2008.

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

HAASS, N.K.; HERLYN, M. Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **JID Symposium Proceedings**. v.10, p. 2, 2005.

HYNES, M. J.; O'COINCEANAINN, M. The Kinetics and mechanisms of reactions of iron (III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1457-1464, 2004.

HUI-DI QIN, YAN-QIU SHI, ZHAO-HUA LIU, ZHONG-GANG LI, HUAI-SHANG WANG, HONG WANG, ZHAO-PING LIU. Effect of Chlorogenic acid on mast cell-dependent anaphylactic reaction. **International Immunopharmacology**. v. 10, p. 1135-1141, 2010.

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

KISS, T.; NAGY, G.; PÉCSI, M.; MICERA, H. K. G.; ERRE, L. S. Complexes of 3,4-dihydroxyphenyl derivatives-X. Copper (II) complexes of chlorogenic acid and related compounds. **Polyhedron**, v., p. 2345-2349, 1989.

KOSTER, M.I. e ROOP, D.R. Genetic pathways required for epidermal morphogenesis. **European Journal of Cellular Biology**, v.83, p. 625-629, 2004.

KRAKAUER, T.; *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **2002**, 24, 113.

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

GÀBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 85-94, 2007.

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa:Plantarum, 1992, 384p.

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

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

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

OLIVEIRA, M. C. L; MATOS, F. J. A, *et al.* **Estudo dos constituintes fixos do piqui do Nordeste (*Caryocar coriaceum* Wittm.)**. In: XVIII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Manaus, 2004.

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

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

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *vernonia Scorpioides* (Lam) persons em modelos de inflamação cutânea em Camundongos**. 2008. 135f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RECIO, M.C., GINER, R.M., URIBURU, L., MÁÑEZ, S., CERDÁ, M., De LA FUENTE, J.R., RIOS, J.L. In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. **Life Science**. v. 66, p. 2509-2518, 2000.

RICE-EVANS, C.A. et al., The relative anti-oxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, Chur, v.22, p.375-388, 1995.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 136, p. 504-510, 2010.

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

TOSHINO, M.; MURAKAMI, K. Interaction of iron with polyphenolic compounds: application to antioxidant characterization. **Analytical Biochemistry**, v. 257, p. 40-44, 1998.

TRINH, HIEN-TRUNG, EUN-AH BAE, YANG-JIN HYUN, YOON-AH JANG, HYUNG-KWON YUN, SEONG-SIG HONG, DONG-HYUN KIM. Antiallergic Effects of Fermented *Ixeris sonchifolia* and Its Constituents in Mice. **Journal Microbiology Biotechnology** . v. 20, p. 217-223, 2009.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 53, p. 4989-4995; 2005.

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

UN-HO, J.; JI-YOUNG, L.; SUNG-KOO, K.; JUNE-KI K.; WON-HWAN, P.; JONG-GUK, K.; SUNG-KWON, M.; CHEORL-HO, K. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sciences**, v. 77, p. 2760-2769, 2005.

VANE, J. In: Gábor M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó 11, 2000.

WANG, H. Q.; KIM, M. P.; TIANO, H. F. LANGENBACH, R.; SMART, R. C. Protein kinase C-alpha coordinately regulates cytosolic phospholipase A2 activity and the expression

of cicloxygenase-2 through different mechanism in mouse keratinocytes. **Molecular Pharmacology**, v. 59, p. 860-866, 2001.

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

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

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões

- ✓ Foi detectada a presença de classes de metabólitos secundários correspondentes a compostos fenólicos, flavonóides e taninos; também foi possível determinar os constituintes majoritários da planta em termos de seu extrato hidroalcoólico e fração metanólica, tendo respectivamente na sua composição os compostos rutina e ácido clorogênico;
- ✓ EHFCC e EHFCC-FM não apresentaram efeito de CIM sobre as cepas bacterianas e fúngicas testadas, e também não apresentaram eficácia modulatória diante as cepas fúngicas; entretanto ambos os extratos demonstraram significância sinérgica frente às cepas bacterianas avaliadas em função de aminoglicosídeos;
- ✓ EHFCC e EHFCC-FM não demonstraram efeito anti-edematogênico tópico mediante aplicação única de óleo de croton; entretanto em aplicação múltipla ambos os extratos apresentaram significância anti-inflamatória;
- ✓ Na presença de ácido araquidônico e fenol, EHFCC e EHFCC-FM demonstram eficácia anti-edematogênica tópica nas concentrações avaliadas, sugerindo ação de mediadores inflamatórios como AA e ROS e mecanismos dependentes da inibição de produtos do AA e radicais livres.;
- ✓ EHFCC apresentou efeito anti-inflamatório tópico sobre aplicação subcutânea de histamina sugerindo mecanismos dependentes da inibição de receptores histaminérgicos ou de eventos induzidos pela histamina, no entanto EHFCC-FM não demonstrou significância edematogênica, o que remete a diferença entre os componentes majoritários presentes, devido a suas divergentes formas de ação;

- ✓ EHFCC e EHFCC-FM apresentaram eficiente ação antioxidante em função de radicais livres de DPPH, sugerindo interligação entre o efeito antiedematogênico já observado em função da presença de agentes ROS e antioxidantes;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, M.B.R.; FERREIRA, R.C.C.; PADILLA, G.; FERREIRA, L.C.S.; COSTA, S.O.P.; Altered Expression of Oligopeptide-Binding Protein (OppA) and Aminoglycoside Resistance in Laboratory and Clinical *Escherichia coli* strains. **Journal of Medical Microbiology**. v. 49, p. 409-413, 2000.

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

AUGUSTO, L.G.S.; GÓES, L. Compreensões integradas para a vigilância da saúde em ambiente de floresta: o caso da Chapada do Araripe, Ceará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23 Sup. v. 4, p. 549-558, 2007.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils-a review. **Food and chemical toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BARRADAS, M. M. **Estrutura do fruto e da semente do piqui – Caryocar brasiliense Camb. (Caryocaraceae)**. 1971.129 f. Dissertação (Mestrado em Botânica)- Universidade de São Paulo, São Paulo. 1971.

BARROS, J. C de S. **Resistência a Aminoglicosídeos em Enterobactérias Isoladas de Fezes de Pacientes Hospitalares**. 2001. Dissertação (Mestrado em Microbiologia-Bacteriologia Clínica). Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2001.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 857p.

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

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

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste**: especialmente do Ceará. Natal: Editora Universitária UFRN, 1960. 540p.

BURBACH, G. J; ANSEL, J.C.; ARMSTRONG, C.A. Cytokines in the skin. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. The New York:Parthenon Publishing Group, p. 299-3319, 2000.

CARDOSO, L. Leishmaniose cutânea: influência da casca e folha do *Caryocar brasiliense* Cambess no curso da infecção. **Departamento de Biologia Geral**. Montes Claros, Universidade Estadual de Montes Claros: 53. 2001.

CHOI, C.W.; KIM, S.C.; HWANG, S.S.; CHOI, B.K.; AHN, H.J.; LEE, M.Y.; PAERK, S.H.; KIN, S.K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**. v. 153, p.1161-1168, 2002.

CHUANCHUEN, R.; NARASAKI, C.T.; SCHWEIZER, H. P. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. **Journal Bacteriology**. 184, p. 5036-5044, 2002.

CHUONG, C.M.; NICKOLOFF, B.J.; ELIAS, P.M., GOLDSMITH, L.A. MACHER, E. MADERSON, P.A. SUNDBERG,J.P.; TAGAMI, H.; PLONKA P.M.; THESTRUPPEDERSON, K.; BERNARD, B.A. SCHRODER, J.M.; DOTTO, P.; CHANG, C.M. ; WILLIAMS, M.L.; FEINGOLD, K.R.; KING, L.E.; KLIGMAN, A.M., REES, J.L.; CHRISTOPHERS, E. What is the “true” function of skin? **Experimental Dermatology**, v. 11, p. 159-187, 2002.

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

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

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

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova Escola**. n. 7, 1998.

DIXON, M.; WEBB, E.C. **Enzymes**, 2^a ed., Longmans, London, 950 p, 1964.

EITEN, G. 1972. The cerrado vegetation of Brazil. **Botanical Review**. v. 38, n. 2. p. 201-341.

FERNANDES, L. C.; FAGUNDES, M.; SANTOS, G. A.; SILVA, G. M. Abundância de insetos herbívoros associados ao pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Cambess.). **Sociedade de Investigações Florestais**. R. Árvore, Viçosa-MG, v.28, n.6, p.919-924, 2004.

FIGUEIREDO, R. W. de; MALA, G. A. *et al.* Propriedades físico-químicas e composição dos ácidos graxos da fração lipídica da polpa e amêndoa do piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm). Resumo publicado em: **Ciências Agrônômicas**, Fortaleza. v. 20, n.1/2, p.135-139 junho/dezembro. 1989.

FIRESTEIN, G.S. **Mechanisms of inflammation and tissue repair**. GOLDMAN, L. e ANSIELLO, D. Textbook of Medicine, 22 ed., p. 227, 2004.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L. *et al.* Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Resumo publicado em: **Revista MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais**. 2006.

FORTE, W.C.N. **Imunologia**: do básico ao aplicado. 2^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.27-33.

FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T. Introduction. FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T. In: **The Biology of the Skin**. 1 ed. New York :The Parthenon Publishing Group, p.15-17, 2000.

FUJITA, Y.; UEHARA, I.; MORIMOTO, Y.; NAKASHIMA, M.; HATANO, T.; OKUDAM T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. Inhibition mechanism of caffeetannins isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase

dependent lipid peroxidation. **Journal of the Pharmaceutical Society of Japan.** v. 108, p. 129-135. Erratum: *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan.* v. 108, p. 591, 1988.

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

GOLDIM J. R.; RAYMUNDO, M. M. **Pesquisa em Modelos Animais.** Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/bioetica/animrt.htm>>. Acesso em: 22 de maio de 2009. 2008.

GROS, L.; SAPARBAEV, M.; LAVAL, J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. **Oncogene,** v. 21, p. 8905-8925, 2002.

HAAKE, A.; SCOTT, G.A.; HOLBROOK, K.A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T In: **The Biology of the Skin.** p.15-17, 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group, 2000.

HADDAD, J.J. Pharmaco-redox regulation of cytokine-related pathways: from receptor signaling to pharmacogenomics. **Free Radical Biology e Medicine.** v.33, p. 907-926, 2002.

HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology e Therapeutics.** v. 96, p. 67-202, 2002.

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

JANA, S.; DEB, J. K. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 70, p. 140-150, 2006.

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 Medical Chemistry.** v. 39, p. 3107-3113, 1996.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatología Estética**. São Paulo: Atheneu, P. 3-8, 2004.

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

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

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M., HOWEL, M.D.; *et al.* New insights into atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, p. 651-657, 2004.

LIMA, C. S. C; MARTINS, E. *et al.* Atividade: Identificação de Triterpenos nos frutos do pequi do Nordeste *Caryocar coriaceum* Wittm. In: **XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**. Livro de resumos. Salvador, 2006.

LJUBOJEVIC, S.; LIPOZENELE, J.; BRENNER, S.; *et al.* Pemphigus vulgaris: a review of treatment over a 19 year period. **Journal European Academy of Dermatology Venereology**, v. 16, p. 599-603, 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa:Plantarum, 1992, 384p.

LULLMANN, H; MOHR, K; HEIN, L. **Farmacologia texto e atlas**. 5ª edição. Porto Alegre: Ed. Artmed. 2008. Tradução de: Augusto Langeloh, *et al.*

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F. Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, H. G.; MONTEIRO NETO, H.; LAGROTA, M. H.; WIGG, M. D.; GUIMARÃES, L. A. S.; LOJA, M. A. S. O.; ARAÚJO, R. R. Estudo estrutural do pequizeiro *Caryocar brasiliense* Camb. Caryocaraceae, sob o aspecto farmacoquímico e botânico. **Revista Brasileira de Farmácia**. Rio de Janeiro, v. 69, n. 1-3, p. 31-41, 1988.

MARQUES, M. C. S. **Estudo fitoquímico e biológico dos extratos de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2001. 91 p. Dissertação. Lavras, 2001.

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

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª Ed. Fortaleza, editora: UFC, 1997.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. 3 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

McGOWAN Jr, J. E. Minimizing antimicrobial resistance: The Key role of the infectious diseases Physician. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 939-942, 2004.

MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 727-737, 1999.

MMA, **Ministério do Meio Ambiente**. 1999. Ações prioritárias para a conservação da biodiversidade do Cerrado e Pantanal. Brasília, MMA / FUNATURA /Conservation International / Fund. Biodiversitas /UnB.

MOREIRA M.R.; PISTORI G.R.; DOMINGUES F.G. e HERNANDES-TERRONES M.G. Potencial alelopático de extratos da raiz de *Caryocar brasiliense* no crescimento de *Panicum maximum*. **XXIII CBCPD**. Uberlândia. 2002.

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

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C. da.; FREITAS, M. F. L. de.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. da. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. Artigo de revisão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

OLIVEIRA, M. C. L.; MATOS, F. J. A, *et al.* Estudo dos constituintes fixos do piqui do Nordeste (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **In: XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Manaus, 2004.

OLIVEIRA, M. M.; GILBERT, B.; MORS, W. B. Triterpenes in *Caryocar brasiliense*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 451, 1968. **Chemical Abstracts**.

OLIVEIRA, A. G. de; SCARPA, M. V. *et al.* Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, jan/Fev, 2004.

PASSOS X.S.; SANTOS S. da C.; FERRI, P.H.; FERNANDES O. de F.; PAULA T.F.; GARCIA A.C. e SILVA M. R. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, p. 623-627. 2002.

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

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHE, F.H.; FADEL-PICHETH, C.M.T.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, A.M. Antioxidant capacity of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves and internal mesocarp extracts. **In: III International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants - ISMAP 2004.**

PEREZ, E. **Diagnose fitoquímica dos frutos de *caryocar brasiliense camb.*, *caryocaraceae*.** 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

PORTUGAL, M.; BARAK, V.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, p. 412-422, 2007.

PRATICÓ, D; DELANTY, N. Oxidative injury in diseases of the central nervous systems: focus on Alzheimer's disease. **Physiology in Medicine**. v. 109, p. 577-585, 2000.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J.M.; JENSEN, J.M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v.17, p.1063-1072, 2008.

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

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

RAUH, L. K. **Avaliação da atividade antiinflamatória tópica da *vernonia scorpioides* (Lam) persons em modelos de inflamação cutânea em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia), 2008. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

RIBEIRO, D. S., FERREIRA, A. de A. Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico de folhas de *Caryocar brasiliense* CAMBESS. **III Fórum gestão/pesquisa/ensino/extensão**. 2009.

RODRIGUES, V. E. G. e CARVALHO, D. A. de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto Rio grande –minas gerais. **Ciências agrotecnicas**. Lavras, v.25, n.1, p.102-123, jan./fev., 2001.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana**. Interpretando o antibiograma. 1ª Ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 118p.

RUSSEL-JONES, R.; POWELL, A.M.; ACLAND, K.; *et al*. The chances of a patient with melanoma developing in transit disease are doubled by undergoing sentinel lymph node biopsy (SLNB). **European Journal of Surgery Oncology**, v.31, p.210-211, 2005.

RYAN, T. The ageing of the blood supply and the lymphatic drainage of the skin. **The International Research and Review Journal for Microscopy**, v. 35, p. 161-171, 2004.

SAMPAIO, S. A.P; CASTRO, R.M.; RIVITTI, E.A. **Dermatologia Básica**, 2ª ed. São Paulo:Artes médicas, p. 1-5, , 2000.

SANO, S. M. e ALMEIDA, S. de P. **Cerrado, Ambiente e Flora**. Embrapa CPAC. Planaltina, DF. 1998.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K. A.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D. P.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G. M.; ROCHA, J. B. T.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A. R.; MENEZES, I. R. A. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 136, p. 504-510, 2010.

SCHRAMM, R e THORLACIUS, H. Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation inhibitory mechanisms of glucocorticoids. **Inflammation research**, v.53, p. 644-652, 2004.

SERHAN, N.C. e SAVIL, J. Resolution of Inflammation: The beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, p.1191-1197, 2005.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V. E. Plantas medicinais, fitomedicamentos e fitoterapia, em Fitoterapia racional – um guia de fitoterapia para as ciências da saúde, **Mande, Ed.**, Barueri, p. 1-40, 2002.

SHERWOOD, E.R e TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anesthesiology**. v. 18, p. 385-405, 2004.

SILVA, M. A. P. da e MEDEIROS-FILHO, S. Morfologia de fruto, semente e plântula de piqui (*Caryocar coriaceum* Wittm.). **Revista Ciência Agronômica**. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE. v.37, n.3, p.320-325, 2006.

SIMÕES, C. M.O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC. p. 1104. 2007.

SOARES, M. A. **Medicamentos não prescritos**. Lisboa: Publicações Farmácia Portuguesa, 1995.

SONG, H.Y.; LEE, J.A.; JU, S.M.; YOO, K.Y.; WON, M.H.; KWON, H.J.; EUM, W.S.; JANG, S.H.; CHOI, S.Y.; PARK, J. Topical transduction of superoxide dismutase mediated by HIV-1 Tat protein transduction domain ameliorates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate

(TPA)-induced inflammation in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 75 n. 6, p. 1348-1357, 2008.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel - A holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v.67, p.477-502, 2000.

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

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

STRID, J.; TIGELAAR, R.E.; HAYDAY, A.C. Skin immune surveillance by T cells - A new order? **Seminars in Immunology**, v.21, p.110-120, 2009.

SOUSA, C.M.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. v.30, n.2, p. 351-355, 2007.

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

TONHI, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v.25, n.4, p.616-623, 2002.

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

VANCINI, R.L.; LIRA, C.A.B.; ABOULAFIA, J.; NOUAILHETAS, V.L.A. **Radical livre, estresse oxidativo e exercício**. São Paulo: Centro de Estudos de Fisiologia do Exercício, Universidade Federal de São Paulo. 2005.

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

WARN - World Antibiotic Resistance Network - An Information System and Monitor of Resistance. Aminoglycoside Modifying Enzymes. 1997.

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

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de Fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, Vol. 24, No. 1, 147-152, 2001.

ANEXO



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

PARECER N°. 006/2010

Projeto de Pesquisa: Estudo farmacológico e antimicrobiano do extrato e frações das folhas de Caryocar coriaceum Witmm. (pequi).

Pesquisador Responsável: Irwin Rose Alencar de Menezes

Data de apresentação ao CEUA: 10/09/10

Registro no CEUA: 10-020

Parecer: Aprovado Ad Referendum na data de 27/12/2010

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