



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

DIÓGENES DE QUEIROZ DIAS

**Estudo zoterápico do óleo fixo de *Phrynops geoffroanus*
(Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) do Nordeste do
Brasil, com análise química e farmacológica (*in vitro* e *in vivo*)**

CRATO – CE

2013

DIÓGENES DE QUEIROZ DIAS

Estudo zoterápico do óleo fixo de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) do Nordeste do Brasil, com análise química e farmacológica (*in vitro* e *in vivo*)

Dissertação apresentada ao 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.

Orientador:

Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida

Co-orientador:

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

CRATO – CE

2013

Dias, Diógenes de Queiroz

D541e Estudo zoterápico do óleo fixo de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) do Nordeste do Brasil, com análise química e farmacológica (*in vitro* e *in vivo*)/ Diógenes de Queiroz Dias/ Crato-CE, 2013.

86p.; il.; color.

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

Orientador: Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida

Co-orientador: Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho

1. Óleo fixo de *Phrynops geoffroanus*, estudo zoterápico;
2. Ácido graxos; 3. Atividade antimicrobiana; I. Título.

CDD: 615.36

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular, outorgado pela Universidade Regional do Cariri, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca central da referida universidade.

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

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida (Orientador)

Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho (Co-Orientador)

Departamento de Química Biológica – URCA

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

Departamento de Biológica – UEPB

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

Departamento de Química Biológica – URCA

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa (Suplente)

Departamento de Química Biológica – URCA

CRATO – CE

2013

Dedico a minha esposa **Irlanda Leandro de Melo**, aos meus pais **José Ademir Dias** e **Maria Valcira de Queiroz Dias**, e aos familiares (*in memoriam*): **Jorge Queiroz Macêdo**, **Maria Alzeneth Queiroz**, **Maria Santa Queiroz**, **Vicente Dias** e **Edith Gomes**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder-me saúde e fé para enfrentar esta jornada;

A todos os meus familiares, em especial a minha irmã, Dayse Mônica de Queiroz Dias, a minha tia Denizete Macêdo Mendes e seu esposo Antônio Mendes de Oliveira, a minha avó, Maria Senhora Queiroz e meu primo, Francisco Sebastião de Araújo Neto, por estarem presentes sempre que precisei de ajuda;

A minha sogra, Maria Augusta Leandro de Melo e ao meu sogro, Francisco de Assis Fernandes de Melo, pelo apoio e incentivo constante;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida, pela oportunidade de realizar este trabalho, pelos ensinamentos e pelo incentivo à pesquisa;

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho, por aceitar ser o meu co-orientador e por todos os ensinamentos;

A Prof^ª. Msc. Fabíola Fernandez Galvão – URCA, e ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa - URCA, por todas as palavras de incentivo e por permitir a realização de testes no LPPN;

À Prof^ª. Dra. Marta Regina Kerntopf - URCA, e ao Prof. Dr. Irwin Rose Alencar Menezes – URCA, por permitirem a realização dos testes farmacológicos no LFQM e pela ajuda nas análises estatísticas;

Ao Prof. Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves – UEPB, por prontamente aceitar participar da minha banca de defesa de dissertação;

Ao Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila - URCA, pela identificação dos répteis;

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri (URCA), Prof^a. Dra. Marta Maria de Almeida Souza e Prof^a. Dra. Maria Arlene Pessoa, pela ajuda incondicional.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, pela colaboração no meu crescimento profissional;

Ao Mário Eduardo Santos Cabral, pela forte amizade forjada nas dificuldades enfrentadas e superadas durante o mestrado;

A Débora Lima Sales, Olga Paiva Oliveira e Felipe Silva Ferreira pela ajuda na realização dos testes farmacológicos;

Aos amigos, Diego Teles Alves, José Guilherme Gonçalves de Sousa, João Antonio Araujo Filho e Samuel Cardoso Ribeiro que se dispuseram como coletores na licença de coleta do IBAMA;

A todos os colegas, especialmente a Luiz Jardelino de Lacerda Neto, Andreza Guedes Barbosa Ramos, Ana Luisa de Albuquerque Siebra, Jaqueline Cosmo Andrade, Maria Flaviana Bezerra de Moraes Braga;

As secretárias do mestrado, Maria Lenira Pereira e Maria Andeciele Rolim de Brito, sempre dispostas a ajudar no que for preciso;

A Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, pela concessão das linhagens de bactérias padrão;

Ao Hospital Universitário da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, pela concessão das linhagens de bactérias multirresistentes;

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

A Secretaria de Educação do Estado do Ceará (SEDUC) por conceder a liberação para cursar o mestrado;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro;

Ao IBAMA por conceder a permissão para coleta dos répteis;

A todos os funcionários da Estação Ecológica de Aiuaba, especialmente ao gerente em exercício, o Sr. Manoel Cipriano de Alencar, sempre disposto a ajudar no que fosse preciso para que a nossa coleta tivesse sucesso;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.
O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará a
vida sem ver nada.

Albert Einstein

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	20
OBJETIVOS.....	23
OBJETIVO GERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
REFERENCIAL TEÓRICO.....	25
ETNOZOOLOGIA	25
ZOOTERAPIA	26
ETNOFARMACOLOGIA	30
FÁRMACOS ORIUNDOS DE RÉPTEIS	30
RESISTÊNCIA MICROBIANA E PRODUTOS NATURAIS	31
INFLAMAÇÃO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	32
INTERFERÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO ...	33
DESCRIÇÃO ZOOLOGICA	34
<i>Phrynops geoffroanus</i> (Schweigge, 1812).....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	38
COLETA DOS RÉPTEIS	38
Materiais laboratoriais utilizados.....	38
Material permanente e equipamentos utilizados	39
OBTENÇÃO DO ÓLEO FIXO DE <i>Phrynops geoffroanus</i> (OPG)	39
DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS	39
ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (CG/EM)	40
TESTE MICROBIOLÓGICO	40
Preparo da solução inicial e das soluções de teste.....	40
Microrganismos	41
Meios de cultura	42
Preparo e padronização dos inóculos bacterianos	42
Avaliação da Atividade Antimicrobiana: determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	42
CIM pelo método de microdiluição em caldo: Execução e Leitura dos Ensaios	42

Avaliação da interferência do OPG sobre a resistência aos antibióticos e antifúngicos: execução e leitura dos ensaios	43
TESTE FARMACOLÓGICO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO ÓLEO DE <i>P. geoffroanus</i> (OPG)	44
Modelo de edema de orelha.....	44
Aspectos éticos da pesquisa	44
OPG (Óleo de <i>Phrynops geoffroanus</i>).....	44
Animais de laboratório.....	44
Drogas e reagentes	45
Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton	45
Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	46
Quantificação do edema.....	46
Análise estatística dos dados	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
Ácidos graxos presentes no OPG	49
Atividade antimicrobiana e moduladora de antibióticos do óleo de <i>P. geoffroanus</i>	50
ATIVIDADE DO ÓLEO FIXO DE <i>P. geoffroanus</i> ATRAVÉS DOS MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA	53
Edema de orelha induzido por aplicação única do óleo de cróton	53
Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....	55
CONCLUSÃO.....	61
REFERÊNCIAS	63
ANEXOS.....	84
ANEXO A – COMPROVANTE DE PARECER DO CEUA – URCA	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produtos de origem animal vendidos em cidades brasileiras. A – cavalos-marinhos secos, B – Sabão produzido a partir de gordura da tartaruga *Podocnemis expansa* e mel de abelha, C – Gorduras de ovelha (*Ovis aries*) e tartaruga (*P. expansa*), D – gordura de Anaconda (*Eunectes murinus*), E – gorduras de Jibóia (*Boa constrictor*) e peixe-boi (*Trichechus sp.*), F – garrafas de plástico com gorduras de guaxinim (*Procyon cancrivorus*), cascavel (*Caudisona durissa*), jacarés (*Paleosuchus palpebrosus* ou *Cayman crocodilus*) e tatu (*Euphractus sexcintus*), G – cabeça e gordura de jiboia (*B. constrictor*) e chocalho e gordura de cascavel (*C. durissa*) e H – Ostra em pó (*Crassostrea rhizophorae*), e as gorduras de diferentes animais prontas para ser comercializado direto em grandes potes de plástico e em frascos pequenos. (Retirado de Alves & Alves, 2011).29

Figura 2 - Estruturas químicas dos ácidos linoléico e linolênico 34

Figura 3 - A espécie *Phrynops geoffroanus*. Foto: do autor 35

Figura 4 – Efeito do OPG puro administrado topicamente nas orelhas de camundongos induzidos pela aplicação única do óleo de cróton. Os animais foram previamente tratados com o controle acetona (C), dexametasona 0,08 mg/orelha (DEX) e OPG puro. Após 15 minutos receberam topicamente óleo de cróton 5% (v/v) em acetona. O gráfico representa a média do edema de orelha (%) e as barras verticais o E.P.M. de 6 animais registrados ao final de 6 horas de aplicação tópica do óleo de cróton. *** p < 0,001 vs controle (ANOVA e Teste de Student – Newman – Keuls). . 53

Figura 5 – Curvas tempo-resposta do efeito do tratamento com OPG puro no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos. O experimento foi conduzido em 9 dias. Os animais receberam óleo de cróton em acetona na orelha direita em dias alternados, indicados por pontos pretos, e o veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha (μm) foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a

primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação do OC), a orelha dos animais recebeu veículo salina, dexametasona (DEX) e OPG bruto (20µL, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 3 dias seguintes (as setas indicam os dias em que houve tratamento). O efeito anti edematogênico dos compostos foi verificado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais, e as barras verticais o E.P.M. (* p < 0,05; *** p < 0,001 vs veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni).56

Figura 6 – Efeito do OPG administrado topicamente nas orelhas de camundongos induzidos pela aplicação múltipla do óleo de cróton. A aplicação do óleo de cróton foi realizada em dias alternados, por um período de 9 dias. A partir do 5º dia as orelhas direitas dos camundongos receberam acetona (C), dexametasona 0,08 mg/orelha e OPG puro 2 vezes ao dia. O gráfico abaixo representa a média do edema de orelha (%), e as barras verticais, o E.P.M. de oito animais que foram utilizados neste teste de administração múltipla do óleo de cróton. ** p < 0,01; *** p < 0,001 vs controle (ANOVA e Teste de Student – Newman – Keuls).57

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.41
- Tabela 2** – Ésteres metílicos identificados no óleo fixo da gordura corporal de *P. geoffroanus*.50
- Tabela 3** – Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do óleo fixo de *P. geoffroanus* frente à microrganismos padrões e multirresistentes.51
- Tabela 4** – Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e na presença de 128 $\mu\text{g/mL}$ do óleo de *P. geoffroanus* frente *Escherichia coli* 27(EC 27), *Staphylococcus aureus* 358 (SA 358) e *Pseudomonas aeruginosa* 22 (PA 22).52
- Tabela 5** – Efeito do OPG sobre o edema induzido pela aplicação única de óleo de cróton.54
- Tabela 6** – Efeito do OPG sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla do óleo de cróton.57

LISTA DE ABEVIATURA SIGLAS E SIMBOLOS

AA- Ácido Araquidônico;
ATCC – *American Type Culture Collection*;
BHI – *Brain Heart Infusion* (infusão de cérebro e coração, inglês);
C- grupo controle;
Céls/mL – Células por mililitro;
CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas;
CIM – Concentração inibitória mínima;
CIM/8 – Concentração subinibitória;
COX – Cicloxigenase;
COX-2 – Cicloxigenase 2;
DEX – Dexametasona;
DMSO – Dimetilsulfóxido;
E.I.M. – Efeito Inibitório Médio da inflamação;
E.P.M. – Erro Padrão da Média;
FMJ – Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte;
HIA – *Heart Infusion Agar*;
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis;
IL-6 – Interleucina 6;
IL-8 – Interleucina 8;
iNOS – Óxido nítrico sintetase induzida;
LOX – Lipoxigenase;
LT₅ – Leucotrienos;
LTB₄ – leucotrieno B₄;
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno ;
M_{od} – Massa do disco retirado da orelha direita;
M_{oe} – Massa do disco retirado da orelha esquerda;
MPE_{cont} – Média do percentual de edema do grupo controle negativo;
MPE_{trat} – Média de percentual de edema do grupo tratado com OPG ou fármaco;
ns – não significativo;
NCCLS – *National Committee for Clinical Laboratory Standard*;
OC – Óleo de cróton;

OPG – Óleo fixo de *Phrynops geoffroanus*;
p – Nível de significância;
P.A. – Para análise;
P. geoffroanus – *Phrynops geoffroanus*;
PG_s – Prostaglandinas;
PGE₂ – Prostaglandinas E₂;
PGF_{1α} – Prostaglandinas F₁ alfa;
PI_s – Prostaciclina;
PLA₂ – Fosfolipase A₂;
PKC – proteína kinase C;
p/v – Relação peso/volume;
SISBio – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade;
TPA – 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol;
Tr – tempo de retenção;
Tr (min)^a – tempo de retenção por minuto;
TX_s – Tromboxanos;
UFC/mL – Unidade Formadora de Colônia por mililitro;
vs – Versus;
v/v – Volume/volume;
Ø – diâmetro

RESUMO

Estudo zoterápico do óleo fixo de *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) do Nordeste do Brasil, com análise química e farmacológica (*in vitro* e *in vivo*)

Répteis são usados na medicina tradicional. *Phrynops geoffroanus* é um quelônio que habita lagos, riachos e rios de países da América do Sul. No Nordeste do Brasil sua gordura corporal é utilizada para fins etnomedicinais, sendo indicada para o tratamento de doenças como dor de garganta, dor de ouvido, caxumba, reumatismo e artrose. Diante disso, este estudo teve por objetivo identificar a composição química do óleo da gordura *Phrynops geoffroanus* (OPG), além de avaliar sua atividade microbiológica e farmacológica. Os animais foram coletados na Estação Ecológica de Aiuaba, Ceará, Brasil. Em seguida foram anestesiados e sacrificados para remoção da gordura corporal. O OPG foi obtido usando hexano como solvente. Os ácidos graxos foram determinados indiretamente usando seus correspondentes ésteres metílicos. A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas. A atividade antimicrobiana do OPG foi testada contra linhagens padrões e multirresistentes das cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida krusei* quando sozinho ou em combinação com antibacterianos e antifúngicos. Na determinação da CIM, o OPG apresentou atividade antifúngica clinicamente relevante frente a *C. krusei* ATCC 6258, com CIM 128µg/mL. Na associação do OPG com os antibacterianos e antifúngicos foi observado efeito sinérgico apenas quando combinado com gentamicina frente à linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* 22. Para avaliar a atividade antiedematogênica foi utilizado o modelo de edema de orelha em camundongos induzido por óleo de cróton (agudo e crônico). O OPG não demonstrou efeito antiedematogênico no modelo de edema de orelha induzido em camundongos por aplicação única do agente flogístico. Entretanto, na aplicação múltipla do óleo de cróton o OPG a partir de 168 h promoveu redução significativa do edema quando comparado com o controle negativo, apresentando efeito inibitório médio de 36,47% ($p < 0,01$).

Palavras chaves: ácidos graxos, atividade antimicrobiana, atividade antiedematogênica, medicina tradicional, zooterapia.

ABSTRACT

Study zotherapy fixed oil *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines: Chelidae) of northeastern Brazil, with chemical analysis and pharmacological (*in vitro* and *in vivo*)

Reptiles are used in traditional medicine. *Phrynops geoffroanus* is a chelonian that inhabits lakes, streams and rivers of South America countries. In Northeastern Brazil your body fat is used for ethnomedicinal, is indicated for the treatment of diseases such as sore throat, earache, mumps, rheumatism and arthrosis. Therefore, this study aimed to identify the chemical composition oil *Phrynops geoffroanus* (OPG), and evaluating its pharmacological and microbiological activity. The animals were collected at the Ecological Station Aiuaba, Ceará, Brazil. They were then anesthetized and euthanized for removal of body fat. The OPG was obtained using hexane as solvent. Fatty acids were determined indirectly using their corresponding methyl esters. The identification of methyl esters of fatty acids was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The antimicrobial activity of the OPG was tested against standard strains and multiresistant strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, and *Candida krusei* when alone or in combination with antibacterial and antifungal. In determining the MIC, the OPG showed clinically relevant antifungal activity against *C. krusei* ATCC 6258 with MIC 128 µg/mL. In the association of OPG with antibacterial and antifungal synergistic effect was observed only when combined with gentamycin front *Pseudomonas aeruginosa* 22. To evaluate the activity antiedematogenic model was used for mouse ear edema induced by croton oil (acute and chronic). The OPG showed no effect on antiedematogenic model induced ear edema in mice by applying single agent phlogiston. However, the application of multiple croton oil from the EPG 168 h resulted in significant reduction of edema when compared to the negative control, showing inhibitory effect mean 36.47% ($p < 0.01$).

Keywords: fatty acids, antimicrobial activity, antiedematogenic activity, traditional medicine, zotherapy.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Produtos naturais de origem animal representam uma importante alternativa para o tratamento de doenças humanas em diversas partes do mundo, especialmente nos países em desenvolvimento (ALVES & ROSA, 2007a). Plantas e animais têm sido utilizados como recursos medicinais desde tempos antigos (ANYINAM, 1995; LEV, 2003; ALVES & ROSA, 2005). Embora os materiais derivados de plantas representem a maioria dos ingredientes utilizados nos sistemas de saúde tradicionais ao redor do mundo, animais também constituem um importante elemento no sentido clínico (COUTINHO, 2010).

Comunidades humanas desenvolveram um acurado saber acerca das propriedades terapêuticas e medicinais dos animais, e o uso desses recursos naturais como remédio pode representar uma opção na substituição de medicamentos que atualmente a indústria farmacêutica coloca à disposição da população, a preços que não condizem com a sua realidade sócio-econômica ou cultural (ALVES & ROSA, 2005). De acordo com Raskin et al. (2002), 75% da população de países em desenvolvimento utilizam os recursos da medicina tradicional prioritariamente em seus sistemas de saúde. Consequentemente, o conhecimento de comunidades tradicionais sobre propriedades farmacológicas da biodiversidade é essencial para a descoberta de fármacos (RAGAVAN, 2008).

É crescente o número de trabalhos que investigam quais são os zoterápicos comercializados para a medicina alternativa (MAHAWAR & JAROLI, 2006), demonstrando que o uso de remédios preparados a partir de animais é uma prática comum em regiões carentes. No Brasil, especialmente na região Nordeste, trabalhos relatam uma grande variedade de animais utilizados para fins medicinal e mágico-religioso, sendo que o uso e a comercialização das espécies ocorrem comumente em mercados públicos, feiras e comunidades de pescadores (ANDRADE & COSTA-NETO, 2005, ALVES & ROSA, 2007b, FERREIRA et al., 2012).

A utilização de animais com fins medicinais levanta discussões sobre a conservação das espécies utilizadas na produção de remédios, pois muitos deles encontram-se presentes nas listas de espécies ameaçadas (ALVES, 2009). Todavia, mesmo com a preocupação para conservar as espécies ameaçadas, entender as relações sobre o uso tradicional de animais é importante, pois, de acordo com Rist & Dahndouh-

Guebas (2006), associar o conhecimento tradicional ao conhecimento científico é imprescindível para o desenvolvimento de estratégias de conservação e gerenciamento dos recursos naturais.

Trabalhos com o objetivo de avaliar o potencial clínico-farmacológico de produtos naturais derivados de animais do Nordeste brasileiro vêm apresentando resultados interessantes: os decoctos da pele dos lagartos *Tropidurus hispidus* e *Tropidurus semitaeneatus*, podem ser uma fonte de produtos naturais com atividade modificadora da ação antibiótica para ser utilizada frente a bactérias multirresistentes (SANTOS et al., 2012). Decocto de *Nasutitermes corniger* (“cupim”) também mostrou possuir atividade modificadora da ação de antibiótica frente a bactérias multirresistentes (COUTINHO et al., 2009). O óleo da banha do lagarto *Tupinambis merianae* possui ação anti-inflamatória (FERREIRA et al., 2010). O ninho de espuma da rã *Leptodactylus vastus* demonstrou possuir atividades antimicrobiana, larvicida, hemoaglutinante, hemilítica e surfactante (HISSA et al., 2009).

No Nordeste do Brasil *Phrynops geoffroanus* (“cágado”) é utilizado por comunidades tradicionais como zoterápico, sendo a sua gordura corporal indicada para tratamento de doenças como: dor de garganta, dor de ouvido, caxumba, reumatismo e artrose (COSTA NETO, 1996; ALVES & ROSA, 2006; ALVES & ROSA, 2007a, MOURA & MARQUES, 2008; ALVES et al., 2009c, ALVES & ALVES, 2011).

O presente estudo tem como objetivo identificar a composição química do óleo oriundo da gordura corporal de *P. geoffroanus*, bem como avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* e sua atividade antiedematogênica utilizando o modelo de edema de orelha *in vivo*. Este é o primeiro relato sobre a investigação das atividades biológicas acima citadas para produto natural obtido da espécie em questão.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Analisar quimicamente o óleo proveniente da gordura de *Phrynops geoffroanus*, bem como verificar as suas atividades antimicrobiana, moduladora e antiedematogênica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obter o óleo oriundo da gordura de *P. geoffroanus* e caracterizá-lo quimicamente;
2. Verificar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo frente a linhagens de bactérias e fungos;
3. Analisar a eficácia do óleo na modulação da resistência bacteriana e fúngica a antibióticos e antifúngicos comumente utilizados;
4. Avaliar a atividade antiedematogênica do óleo de *P. geoffroanus*, através do modelo de edema em orelha, induzido pela aplicação tópica do agente flogístico óleo de cróton (modelo agudo e crônico).

REFERENCIAL TEÓRICO

REFERENCIAL TEÓRICO

ETNOZOOLOGIA

Ao longo de toda a história encontramos várias evidências da relação entre os seres humanos e os outros animais, uma conexão antiga e de extrema importância para as sociedades humanas, uma vez que estes mantêm estreitas interações de dependência ou co-dependência dos recursos faunísticos (ALVARD et al., 1997; FOSTER & JAMES, 2002; FRAZIER, 2007; ALVES et al., 2009b). Pinturas rupestres que representavam animais selvagens e figuras humanas, além da caça, são exemplos de antigas atividades humanas que se tem conhecimento (ALVES & SOUTO, 2011).

Animais sempre foram caçados pelo seu valor utilitário e também pela necessidade dos humanos se defenderem dos grandes predadores (ALVES & SOUTO, 2010). Ao longo dos séculos essa relação de co-dependência também contribuiu para a formação de vínculos afetivos, onde muitas espécies foram e continuam sendo mantidas como animais de estimação (HOOVER, 1998; FRANKE & TELECKY, 2001; ALVES et al., 2010).

A domesticação de animais permitiu inicialmente enriquecer a dieta do homem com uma provisão regular de carne e leite, e mais tarde, proporcionou uma nova fonte de energia muscular, além da humana, como montaria ou força de tração de arados e carros, multiplicando, dessa forma, a capacidade produtiva do homem e sua mobilidade espacial (RIBEIRO, 1998).

A relação com a fauna ultrapassa o mero valor utilitário, existindo também uma forte relação sobrenatural entre os mundos humano e animal desde épocas remotas, onde todas as culturas humanas produziram mitos, e em todas elas encontramos a integração dos animais no seu imaginário (ALLABY, 2010). A serpente talvez seja o mais comum símbolo onírico da transcendência, representada pelo símbolo terapêutico do deus romano da medicina, Esculápio, que sobreviveu nos tempos modernos como símbolo da profissão médica (BIERLEIN, 2004). Na aurora das civilizações do velho mundo, embora de maneira exagerada, houve o reconhecimento generalizado de que determinadas espécies de animais compartilhavam importantes características com os humanos e, nesse contexto, animais como o cavalo, a cobra e o gado, por exemplo,

estiveram associados a simbologias de poder/dominação ou libido/fertilidade (SCHWABE, 1994).

A variedade de interações pretéritas e atuais que as culturas humanas mantêm com os animais é abordada pela perspectiva da etnozootologia, uma ciência que busca compreender como os mais variados povos percebem e interagem com os recursos faunísticos ao longo da história da humanidade (ALVES & SOUTO, 2011).

Historicamente, as publicações etnozootológicas resultaram de estudos desenvolvidos em diferentes áreas, como a zootologia, ecologia humana, sociologia e antropologia, um reflexo do caráter interdisciplinar desta ciência (ALVES & SOUTO, 2011). Considerando que a etnozootologia faz parte de uma ciência maior, a etnobiologia, o histórico de desenvolvimento se sobrepõem (ALVES & SOUTO, 2010).

Estudos etnobiológicos têm demonstrado que populações nativas ou locais possuem um profundo conhecimento sobre a natureza e sobre a importância de vários recursos biológicos para os mais variados povos (BEGOSSI et al., 1999; HANAZAKI et al., 2009, ALVES et al., 2010). Esse conhecimento vem ganhando atenção em todo o mundo, uma vez que os saberes e técnicas tradicionais completam o conhecimento científico em áreas como: pesquisa e avaliação de impactos ambientais; manejo de recursos e desenvolvimento sustentável (MORIN-LABATUT & AKATAR, 1992; JOHANNES, 1993, SILITOE, 1998).

Por muitos anos, os estudos etnobiológicos estavam mais voltados às plantas medicinais, porém, recentemente, diferentes investigadores demonstraram que na interação cultura/natureza é notável a utilização da fauna para fins medicinais em diferentes sociedades humanas (COSTA-NETO, 1994; MARQUES, 1995). Embora o uso de animais para tratamento de doenças seja um fenômeno historicamente antigo (COSTA-NETO, 1999), pouco foi investigado sobre esta prática no Brasil.

ZOOTERAPIA

A medicina popular é um fenômeno que marca a cultura de cada povo (MELO, 1999). Essa prática médica é transmitida por gerações, especialmente pela tradição oral e geralmente praticada por especialistas tradicionais, como erveiros, médiuns, parteiras, benzedores e curandeiros, que utilizam diferentes recursos vegetais, animais e minerais

para curar e tratar doenças e enfermidades que afetam não apenas os seres humanos, mas também os animais (PEREIRA & SOUTO, 1999).

Incluída no rol das práticas médicas tradicionais encontra-se a zooterapia, que pode ser definida como a cura de doenças de humanos e animais por meio do uso de terapêuticos baseados em remédios obtidos de animais ou derivados destes (ANDRADE & COSTA-NETO, 2006). A palavra “doença” é aqui utilizada em um sentido amplo, referindo-se tanto às enfermidades de origem personalística (provocada por um agente humano ou sobrenatural) quanto àquelas de origem naturalísticas (causadas pela intervenção de causas ou forças naturais), incluindo-se desde estados dolorosos à perturbações de origem psíquicas (FOSTER, 1983).

O uso de produtos terapêuticos de origem animal tem constituído parte significativa do inventário de substâncias medicinais presentes em várias culturas humanas (PINA, 1946; LEV, 2003). No período greco-latino os sacerdotes nos templos de Esculápio recomendavam aos leprosos a carne de víboras (CHEMAS, 2010). Na Bíblia, existe uma passagem em que o Anjo Rafael ensina Tobias a preparar um remédio com o suco biliar, o coração e o fígado de um peixe (COSTA-NETO, 1999). No século XIII, Alberto Magno prescreve os testículos dos porcos aos homens impotentes, o útero das lebres às fêmeas inférteis, e o cérebro dos camelos, leões e lebres contra a epilepsia e a loucura (MOUSSON-LANAUZE, 1926). Já em plena civilização moderna, em junho de 1889, o médico Charles-Édouard Brown-Séquard escandalizou o mundo científico e leigo, ao relatar para a *Société de Biologie*, em Paris, o impressionante aumento da força e vigor físico e mental, experimentado em si mesmo após uma injeção subcutânea de um líquido extraído dos testículos de cães e cobaias, onde esta experiência se tornou o marco inicial da endocrinologia (BROWN-SÉQUARD, 1893).

Uma grande variedade animais (selvagens e domésticos) constitui a farmacopéia de muitos povos ao redor do mundo, sendo que a prática zoterápica, por ser historicamente antiga e geograficamente disseminada, levou Marques (1994) a publicar a “hipótese da universalidade zoterápica”, segundo a qual toda sociedade humana que apresenta um sistema médico utiliza remédios feitos à base de animais.

Nas práticas zoterápicas, os animais são utilizados integralmente ou em partes, como pena, perna, couro, dente, banha (gordura), leite, carne, esporão, chifre, espinho, escama, unha, sangue, pênis, ossos, fígado, carne, coração, cabeça, testículo, olho, e até

produtos do metabolismo como fezes e urina são recursos medicinalmente utilizáveis (ALVES & ALVES, 2011). Animais vivos também são empregados no tratamento de doenças. Na cidade de São Félix, localizada no estado da Bahia, Andrade & Costa-Neto (2005) registraram que os moradores cospem na boca de peixes como o cambotá (*Callichthys sp.*) e o piauí (*Leporinus sp.*), soltando-os em seguida, visando obter o tratamento de doenças como tuberculose, diabetes e câncer. No semiárido dos estados da Paraíba e Pernambuco, o canção (*Cyanocorax cyanopogon*) é utilizado em “simpatia” popular para tratar processos asmáticos, devendo essa ave ser alimentada com os restos alimentares do enfermo (ALVES et al., 2008a; ALVES et al., 2009a).

Diferentes maneiras de preparação e administração de recursos zoterápicos são relatadas. Partes duras como ossos e chocalhos de cobras são postos para secar ao sol e em seguida moídas para obter um pó, que será ingerido como chá ou associado às refeições (ALVES & ALVES, 2011). A cabeça da paca (*Agouti paca*) é utilizada como amuleto para facilitar o momento do parto (SILVA, 2008). Secreções, banhas e óleos geralmente são massageados sobre áreas afetadas por enfermidades ou ingeridos (ALVES & ROSA, 2006). Alguns produtos zoterápicos podem ser usados em associação com plantas medicinais em “garrafadas”, uma mistura composta por várias plantas embebidas em cachaça (aguardente de cana-de-açúcar) ou em vinho branco e armazenadas em garrafas (CAMARGO, 1975; NGOKWEY, 1995; AGRA et al., 2006).

A banha (gordura) destaca-se como um dos recursos zoterápicos de maior uso. Dos peixes, tem-se o registro da banha do peixe-elétrico (*Electrophorus electricus*), que é usada para pancadas, torções e picadas de insetos, e da traíra (*Hoplias malabaricus*), recomendada para problemas oftálmicos (catarata). Répteis têm como citação o uso das banhas de cascavel (*Crotalus durissus*) e da jibóia (*Boa constrictor*) para tratar reumatismo (Figura 1, p. 29). Das aves, registra-se o uso da banha de ema (*Rhea americana*), que é usada para dores em geral, e da galinha (*Gallus domesticus*), recomendada para tratar catarro. Nos mamíferos, cita-se o uso medicinal do sebo de carneiro castrado (*Ovis aries*) para tratar torções, e a banha da capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) é utilizada para reumatismo (COSTA-NETO & ALVES, 2010; ALVES & ALVES, 2011).



Figura 1 – Produtos de origem animal vendidos em cidades brasileiras. A – cavalos-marinhos secos, B – Sabão produzido a partir de gordura da tartaruga *Podocnemis expansa* e mel de abelha, C – Gorduras de ovelha (*Ovis aries*) e tartaruga (*P. expansa*), D – gordura de Anaconda (*Eunectes murinus*), E – gorduras de Jibóia (*Boa constrictor*) e peixe-boi (*Trichechus sp.*), F – garrafas de plástico com gorduras de guaxinim (*Procyon cancrivorus*), cascavel (*Caudisoma durissa*), jacarés (*Paleosuchus palpebrosus* ou *Cayman crocodilus*) e tatu (*Euphractus sexcintus*), G – cabeça e gordura de jiboia (*B. constrictor*) e chocalho e gordura de cascavel (*C. durissa*) e H – Ostra em pó (*Crassostrea rhizophorae*), e as gorduras de diferentes animais prontas para ser comercializado direto em grandes potes de plástico e em frascos pequenos. (retirado de ALVES & ALVES, 2011).

ETNOFARMACOLOGIA

Define-se etnofarmacologia como “a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem” (BRUHN & HOLMSTEDT, 1982). Esta ciência permite a formulação de hipóteses quanto à(s) atividade(s) farmacológica(s) e a(s) substâncias ativas responsáveis pelas ações terapêuticas relatadas (ELISABETSKY & SETZER, 1985; ELISABETSKY, 1986). Neste aspecto, a seleção de espécies animais e vegetais para a pesquisa e desenvolvimento baseados na informação de um efeito terapêutico, pode se constituir num valioso atalho para descoberta de fármacos. Por se basear em informações de utilidade terapêutica, a etnofarmacologia pode levar a identificação de produtos com mecanismos de ação desconhecidos, ao contrário da abordagem mecanicista, que se baseia na interferência dos produtos em teste com mecanismos farmacodinâmicos predeterminados (ELISABETSKY, 1993).

Desde a publicação de trabalhos, principalmente a partir da década de 1990 sobre o potencial da etnofarmacologia para a descoberta de novos fármacos, a pesquisa envolvendo os saberes e práticas “tradicionais” ganhou novo sentido, indo além da simples compilação de plantas e animais (MORAES et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007).

Segundo Albuquerque & Hanazaki (2006) vivencia-se um momento propício e produtivo para a pesquisa científica que envolve a aplicação de conhecimentos locais sobre o uso de plantas e animais medicinais. Deixou-se para trás a época em que esse saber era subestimado, iniciando hoje uma era de cooperação de saberes.

FÁRMACOS ORIUNDOS DE RÉPTEIS

Répteis estão entre as espécies animais usadas na medicina popular, e suas práticas populares relacionadas com a prevenção ou cura de doenças foram registradas em diferentes contextos sócio-culturais do mundo (ZHOU & JIANG, 2004; MAHAWAR & JAROLI, 2006, 2008; VAZQUEZ et al., 2006; ALVES & PEREIRA FILHO, 2007; ALVES et al., 2008a,b). No Brasil a utilização medicinal destes animais

é documentada desde o início do período colonial (SILVA et al., 2004; ALMEIDA, 2005; ALVES et al., 2007). *Iguana iguana* (camaleão), *C. durissa* (cascavel) e *Micrurus ibiboboca* (cobra coral) são exemplos de répteis utilizados na medicina tradicional desde o período colonial (ALVES et al., 2009b).

Constituintes químicos e as atividades farmacológicas de alguns produtos animais já são conhecidas, porém, estudos etnofarmacológicos focados em remédios de origem animal são muito importantes para indicar o possível uso terapêutico desses produtos naturais, bem como suas possibilidades de uso farmacológico (KUNIN & LAWTON, 1996). De acordo com Harvey (2008) 225 drogas estão em estágio de desenvolvimento a partir de produtos naturais, onde estas novas drogas estão sendo produzidas para combater: câncer, agentes infecciosos, doenças renais, doenças vasculares, doenças gastrointestinais, dermatites, doenças metabólicas e hormonais. Dentre as drogas produzidas nos últimos anos a partir de produtos naturais, 24 são provenientes de substâncias derivadas de animais.

Trabalhos vêm sendo realizados com o intuito de descrever as propriedades clínico-farmacológicas das substâncias isoladas a partir de répteis. O hormônio exendina-4, obtido da saliva do lagarto monstro-de-gila (*Heloderma suspectum*) hoje é utilizado como nova alternativa terapêutica para o controle da diabetes mellitus tipo 2 (ROBLEJO & DELGADO, 2012). O Captopril (Capoten), usado no tratamento da hipertensão, foi desenvolvido a partir da peçonha da jararaca comum (*Bothrops jararaca*) (FERREIRA, 1993). Outro novo produto é o enpak (sigla para *endogenous pain killer*), uma proteína com poder analgésico, obtida do veneno da cascavel (*Crotalus terrificus*), cujo efeito pode vir a ser 600 vezes mais poderoso que a morfina (BELLINGHINI, 2004).

RESISTÊNCIA MICROBIANA E PRODUTOS NATURAIS

Nos anos 60 e 70, o uso indiscriminado de penicilinas semi-sintéticas resistentes a penicilinas e de cefalosporinas favoreceu o aparecimento de linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, e na mesma época, o uso extensivo de ampicilina favoreceu o aparecimento de cepas de *Escherichia coli* ampicilina – resistentes. Entre os anos 70 e 80, as bactérias Gram-negativas eram o grande obstáculo

terapêutico, mas no novo milênio, as Gram-positivas passaram também a ocupar um lugar de destaque (ROSSI & ANDREAZZI, 2005). Enquanto a resistência microbiana tem crescido de forma significativa, o número de antibióticos em pesquisas diminuiu drasticamente nos últimos anos (SWARTZ, 2000).

A situação atual da resistência às drogas tem sua origem em muitos fatores, incluindo a seleção de mutantes resistentes por exposição a agentes antimicrobianos, transferência de determinantes genéticos de resistência entre cepas bacterianas e disseminação clonal de cepas resistentes entre pacientes hospitalizados e entre instituições hospitalares. Como consequência está o aumento da morbidade e mortalidade entre pacientes, a redução do número de drogas utilizáveis por futuras gerações de pacientes, além do impacto econômico trazido pelos custos com infecções (McGOWAN JR, 2004).

Com o aumento da resistência microbiana aos antibióticos, o uso dos produtos naturais representa uma alternativa interessante para o tratamento de doenças bacterianas (MBWAMBO et al., 2007). Muitos produtos têm sido avaliados não apenas para a atividade antimicrobiana direta, mas também como agentes moduladores de resistência (GIBBONS, 2004).

Nos últimos anos, vários estudos foram realizados em diferentes países para demonstrar a eficácia de produtos naturais frente às infecções bacterianas (BENOIT-VICAL, 2006). Diversos compostos obtidos de produtos naturais têm atividade direta contra muitas espécies de bactérias, aumentando a atividade ou revertendo a resistência natural de uma bactéria específica para determinados antibióticos (COUTINHO et al., 2009).

INFLAMAÇÃO E MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

O termo inflamação é utilizado para denotar um complexo fenômeno do organismo frente a um processo, a um antígeno ou lesão celular ou tecidual, de caráter salutar, com o propósito de erradicar o agente agressor e promover a reparação tecidual (SHERWOOD & TOLIVER-KINSKY, 2004). De modo geral, o processo inflamatório compreende três fases: a fase aguda, caracterizada pelos eventos vasculares, observando-se a vasodilatação local e o aumento da permeabilidade vascular; a fase

tardia onde se observa a migração celular, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a fase proliferativa crônica, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose, podendo causar a dor através da ativação e sensibilização de nociceptores (LESS et al., 2004).

Na fase aguda, a inflamação é de curta duração e apresenta os sinais cardinais: a dor, o calor, o rubor, o tumor e a perda da função (ROCK & KONO, 2008). A fase crônica perdura por um período indeterminado, variando de acordo com os tipos de mediadores celulares humorais envolvidos. As modificações decorrentes da liberação destes mediadores levam ao intumescimento tecidual, devido ao extravasamento de proteínas plasmáticas, com consequente saída de água para o tecido e a penetração de células inflamatórias, a fim de neutralizar o agente nocivo (LEY, 2002; SPINOSA et al., 2006).

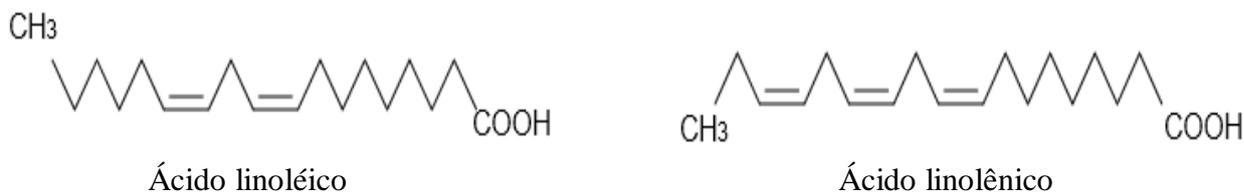
A preocupação de conhecer melhor as reações inflamatórias progrediu após a descoberta do primeiro mediador da inflamação – a histamina. Daí em diante, os estudos experimentais se multiplicaram, possibilitando não só melhor compreensão do processo inflamatório, mas também na investigação de drogas anti-inflamatórias, muito úteis no tratamento das inflamações. Os mediadores da inflamação são liberados em tempos diferentes durante o processo inflamatório. Isso significa que os fenômenos irritativos não atuam somente no início, mas pode perdurar por tempo variável durante o processo, razão pela qual a duração das inflamações é variável de caso para caso (PEREIRA & BOGLIOLO, 1993).

INTERFERÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO

Os ácidos graxos foram vistos até o início do século XX exclusivamente como uma forma eficiente de armazenar energia, podendo estes ser sintetizados pelo organismo a partir de proteínas e carboidratos. Desde então, várias evidências apontaram que uma dieta pobre em ácidos graxos está associada a síndromes que podem levar à morte. Criou-se então o conceito de ácidos graxos essenciais – ácidos graxos imprescindíveis ao organismo, que não podem ser sintetizados pelo mesmo e que, portanto, devem ser oferecidos na alimentação (CARMO & CORREIA, 2009).

Duas “famílias” de ácidos graxos são essenciais: os ácidos graxos ômega-3 e os ácidos graxos ômega-6 (CARMO & CORREIA, 2009). Os principais representantes dos ácidos graxos ômega-3 são: o ácido linolênico (Figura 2, p. 34), o ácido eicosapentaenoico (ou EPA) e o ácido docosahexaenóico (ou DHA); e os principais representantes dos ácidos graxos ômega-6 são: o ácido linoléico (Figura 2, p. 34) e o ácido araquidônico (AA) (ANDRADE & CARMO, 2006). Estes ácidos podem modular interações célula-célula e a sinalização intracelular. Desta forma, a alteração de fosfolípídeos de membrana quanto à composição de ácidos graxos podem modular a sua fluidez, o que modifica a ligação de citocinas aos seus receptores específicos. Os efeitos dos ácidos graxos em atenuar o processo inflamatório podem ocorrer de diversas maneiras: vasoconstrição, quimiotaxia, adesão, diapedese, ativação e morte celular, sendo que a maioria destes eventos ocorre sobre a via dos derivados do ácido araquidônico como prostraglandinas, leucotrienos, tromboxanos e lipoxinas (POMPÉIA et al., 2000; CALDER, 2003). Além disso, os ácidos graxos são precursores primários de mediadores lipídicos importantes durante o processo inflamatório, como ácido araquidônico (AA), prostraglandinas (PG), tromboxanos (TX) e leucotrienos (LT) (CALDER, 2003).

Figura 2 - Estruturas químicas dos ácidos linoléico e linolênico



DESCRIÇÃO ZOOLOGICA

Phrynops geoffroanus (Schweigger, 1812)

Entre as 278 espécies de quelônios que existem no mundo, aproximadamente 20% delas ocorrem na América do Sul, representando um total de 20 famílias, na qual encontramos a família Chelidae, cujos membros são conhecidos popularmente como

“cágados”, sendo esta a mais rica, contendo um total de 23 espécies, sendo que 19 delas ocorrem no Brasil (SOUZA, 2004).

Phrynops Geoffroanus (Figura 3, p. 35) é um cágado cuja dieta é predominantemente carnívora (MOLINA, 1991). Popularmente é conhecido como cágado-de-barbela ou cágado-de-pescoço-de-cobra (VOGT, 2008). A espécie *P. Geoffroanus* está inserida ao complexo *Phrynops Geoffroanus* (composto por *Phrynops Hilarii*, *Phrynops Tuberosus*, *Phrynops Williamsi* e *Phrynops Geoffroanus*) (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). Possui carapaça baixa que oferece pequena resistência ao deslocamento na água, e patas anteriores modificadas em remo auxiliando sua locomoção (POUGH et al., 1999). Linhas negras sobre o pescoço permitem diferenciá-lo de *Phrynops Tuberosus*, que possui no pescoço linhas alternadas brancas e pretas (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). Encontra-se largamente distribuído nos países da América do Sul (IVERSON, 1992), onde parece habitar preferivelmente lagoas, riachos e rios de maior volume (PRITCHARD & TREBBAU, 1984). A reprodução ocorre durante a estação seca (de dezembro a abril), quando o nível dos rios desce e surgem praias arenosas (RUEDA-ALMONACID et al., 2007). As desovas são isoladas e podem ocorrer até quatro vezes por período reprodutivo (VOGT, 2008).



Figura 3 – A espécie *Phrynops Geoffroanus*. Foto: do autor

Casco, sangue, ovos e gordura provenientes de quelônios de água doce são citados como zoterápicos utilizados nas regiões Norte e Nordeste do Brasil (ALVES &

SANTANA, 2008; FERREIRA et al., 2009a,b). No estudo realizado por Almeida (2007), este demonstrou que já no século XVII havia relato do uso medicinal de cágados (*Phrynops spp.*) no nordeste brasileiro. Comunidades tradicionais utilizam *P. geoffroanus* como zoterápico para o tratamento de doenças em humanos e animais domésticos (ALVES et al., 2002; ALVES & ALVES, 2011; SOUTO et al., 2011; SOUTO et al., 2012). O principal material extraído deste animal para fins medicinais é a banha, porém a literatura científica disponível revelou a inexistência de dados publicados sobre testes farmacológicos com a banha desta espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA DOS RÉPTEIS

Através do método de coleta ativa, técnica descrita por Auricchio & Salomão (2002), os quelônios foram coletados (permissão para coleta SISBio/IBAMA: n° 30223-1, processo n° 76197587) na Estação Ecológica de Aiuaba (06°36'S e 40°07'W), Ceará, Brasil, em Setembro de 2011. Os animais foram anestesiados através da associação entre quetamina (60mg/Kg) e xilazina (6mg/Kg) (VIANA, 2003), e em seguida sacrificados para remoção da gordura corporal. As espécimes testemunhos foram fixadas em álcool a 70% e depositadas na coleção de zoologia da Universidade Regional do Cariri – URCA (LZ-URCA 1328 e LZ-URCA 1329).

Materiais laboratoriais utilizados

As substâncias utilizadas nos ensaios encontram-se relacionadas a seguir:

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

Material permanente e equipamentos utilizados

Equipamentos utilizados durante a execução dos ensaios:

Equipamentos	Modelo/Marca/Quantidade
Balança Analítica de precisão	Metler Toledo AB204
Banho Maria	100, Fanem Ltda.
Cronômetros digitais	<i>LivStar</i>
Extrator de Soxhlet	Quimis
Materiais de biossegurança	–
Material cirúrgico	Pakistan
Paquímetro digital	Jomarca, Ref. N° 205509
Perfurador de couro (<i>punch</i>)	Circunferência de 6 mm Ø
Pipetas automáticas	Maxipette
Rotaevaporador	Fisatom
Seringas estéreis	Becton Dickinson (BD)
Autoclave de esterilização a vapor quente	Phoenix Lufenco
Estufa de secagem e esterilização	Solab SL 100
Placas de microdiluição estéreis	Biofil
Tubos Eppendorff	Eppendorff
Tubos Falcon	Cralplast
Vidrarias gerais	Pyrex

OBTENÇÃO DO ÓLEO FIXO DE *Phrynops geoffroanus* (OPG)

O óleo foi extraído da gordura corporal localizada na região ventral dos quelônios. A extração foi realizada por 6h em aparelho Soxhlet usando hexano como solvente. Após a mistura ser filtrada e decantada, o óleo foi seco em banho-maria a 70 °C por 2h e posteriormente armazenado em baixa refrigeração (< 4°C) até o momento dos testes.

DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os ácidos graxos foram determinados indiretamente utilizando os seus correspondentes ésteres metílicos. O óleo (0,2g) foi saponificado por 30 minutos sob o refluxo com solução de hidróxido de potássio em metanol, seguindo o método descrito

por Hertman e Lago (1973). Após adequado tratamento e ajuste de pH, os ácidos livres foram metilados com metanol por catálise ácida a fim de obter os respectivos ésteres metílicos.

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

A análise dos constituintes fixos do OPG foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massas (CG/EM) Hewlett-Packard, modelo 5971, usando coluna capilar não-polar DB-1 de sílica fundida (30 m x 0,25 mm id., película de 0,25 µm); carreado por gás hélio; velocidade de fluxo 0,8 mL/min e modo de divisão. A temperatura do injetor foi de 250°C e a do detector de 200°C. A temperatura da coluna foi programada de 35°C para 180°C em 4°C/min em seguida 180°C para 250°C em 10 °C/min. Os espectros de massa foram gravados a partir de 30-450 m/z. Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70 eV, com os da base de dados usando a biblioteca construída através do espectrômetro (Wiley, 229) e outros dois computadores utilizando índices de retenção como uma pré-seleção (ALENCAR et al., 1984; ALENCAR et al., 1990), bem como por comparação visual de fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (STENHAGEN, 1974; ADAMS, 2001).

TESTE MICROBIOLÓGICO

Preparo da solução inicial e das soluções de teste

No preparo da solução inicial, o OPG foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO – Merk, Darmstadt, Alemanha), observando a seguinte proporção: 20mg do OPG solubilizado em 1mL de dimetilsulfóxido, obtendo assim uma concentração inicial de 20mg/mL. Posteriormente esta solução foi diluída em água destilada, atingindo assim a concentração de 1024µg/mL e reduzindo a concentração de DMSO para 10%, e a

partir desta efetuaram-se diluições seriadas 1:2, durante o teste de microdiluição, obtendo-se as concentrações de extrato variando de 512 a 8µg/mL e DMSO para 5% de concentração.

Microrganismos

Os experimentos foram realizados com isolados clínicos de *Escherichia coli* (EC27), resistentes a neomicina e gentamicina (baixo nível) e a tobramicina, amicacina e neomicina, *Staphylococcus aureus* 358 (SA358), resistente a vários aminoglicosídeos e *Pseudomonas aeruginosa* (PA22) (Tabela 1, p. 41). As linhagens de *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362, foram usadas como controle positivo. Para a avaliação da atividade antifúngica foram testadas cepas de *Candida albicans* ICB 12 e *Candida krusei* ATCC 6258. Todas as linhagens foram mantidas em meio *Heart Infusion Agar* slants (HIA, Difco). Antes dos ensaios, as células foram cultivadas por 24 horas a 37°C em *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco).

Tabela 1 – Origem bacteriana e perfil de resistência a antibióticos.

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

Meios de cultura

Nos ensaios microbiológicos foram utilizados os seguintes meios de cultura: *Agar Heart Infusion* – HIA (Difco laboratories Ltda), *Brain Heart Infusion broth* – BHI (concentração indicada pelo fabricante e 10%) (Acumedia Manufactures Inc.). Todos os meios de cultura foram preparados segundo as especificações do fabricante e esterilizados em autoclave.

Preparo e padronização dos inóculos bacterianos

As culturas de bactérias foram mantidas a 4°C em HIA. Antes dos testes, as linhagens foram repassadas para o meio acima citado e incubadas a 35°C por 24 horas. As linhagens replicadas a serem testadas foram inoculadas em BHI na concentração recomendada pelo fabricante e incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente. Suspensões com crescimento bacteriano foram diluídas em Caldo BHI em concentração de 10% até a obtenção de 10^5 céls/mL (NCCLS, 2000).

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

Os ensaios para a determinação da CIM do OPG foram efetuados através do método de microdiluição em caldo, com concentrações variando de 512 a 8 µg/mL.

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

Este método utiliza pequenos volumes de meio e de amostra, distribuídos em cavidades de microplacas estéreis. Na concentração de 1024 µg/mL, volumes de 100 µL foram diluídos seriadamente 1:2 em caldo BHI 10%. A última cavidade foi usada como

controle. As placas preenchidas foram incubadas a 35°C por 24 horas (JAVADPOUR et al., 1996).

Para evidenciar a CIM das amostras foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v). Após a incubação, 20 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas passaram por um período de incubação de 1 hora em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa devido a redução do pH da resazurina indicou o crescimento bacteriano (MARKHAN, 1998; PALOMINO et al., 2002), evidenciado pela cor azul inalterada. Para a determinação do crescimento ou inibição das linhagens fúngicas foi utilizado o método da turbidez, que indica que houve crescimento dos fungos quando ocorre a turvação dos poços.

Avaliação da interferência do OPG sobre a resistência aos antibióticos e antifúngicos: execução e leitura dos ensaios

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

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

TESTE FARMACOLÓGICO: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO ÓLEO DE *P. geoffroanus* (OPG)

Modelo de edema de orelha

O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória tópica de compostos, uma vez que é uma metodologia bastante simples e que permite verificar a atividade de compostos no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (GÁBOR, 2000).

Aspectos éticos da pesquisa

Este projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Regional do Cariri (CEUA-URCA), com parecer 004/2012 (anexo).

OPG (Óleo de *Phrynops geoffroanus*)

Na realização dos testes farmacológicos o OPG foi utilizado na concentração pura.

Animais de laboratório

Foram utilizados nos ensaios *in vivo* para a avaliação da atividade antiedematogênica pelo modelo de edema de orelha, camundongos (*Mus musculus*), da linhagem *Swiss*, adultos, de ambos os sexos, cuja massa corpórea variou entre 25-35g, aclimatizados em temperatura média de 22°C (\pm 3°C) e umidade controlada (60-80%), mantidos em ciclos claro/escuro de 12 horas, além de livre acesso a água e ração comercial para roedores (Labina, Purina®). Os animais foram cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ) e mantidos no Biotério

Experimental da Universidade Regional do Cariri – URCA, em concordância com as normas e procedimentos de biossegurança para biotérios (CARDOSO, 1998-2001) e bioéticas (BAZZANO, 2006). Os camundongos foram mantidos no laboratório de experimento durante pelo menos uma hora antes da realização dos testes, para adaptação.

Drogas e reagentes

O óleo de cróton foi adquirido da Sigma Chemical (USA), dexametasona (Decadron®) foi adquirido da Aché (Brasil) e a acetona de grau analítico a partir da Dinâmica (Brasil).

Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

O óleo de cróton é um agente flogístico que possui como constituintes químicos ésteres de forbol, sendo o TPA (ácido 13-acetato de 12-0-teracanoilforbol) o agente com potencial irritante. Vários mediadores da inflamação são estimulados pela sua aplicação, ocorrendo liberação de aminas vasoativas e de derivados do ácido araquidônico (LAPA, 2003). Assim, para avaliar a atividade tópica por tratamento agudo do OPG, grupos de camundongos (n = 6/grupo) tiveram suas orelhas direitas tratadas topicamente com 20µL de acetona, dexametasona 4mg/mL (0,08mg/orelha) e OPG na concentração pura, esperando 30 minutos para absorção. Posteriormente, 20µL de óleo de cróton 5% (v/v) foram administrados topicamente nas orelhas direitas e 20µL do veículo acetona nas orelhas esquerdas. Após 6 horas, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e discos de 6 mm de diâmetro foram obtidos das orelhas utilizando um *punch* (perfurador de couro metálico) para a avaliação do edema (TUBARO, 1985).

Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

O processo inflamatório crônico foi produzido pela administração de 20µL de óleo de cróton 5% (v/v) nos camundongos (n = 8/grupo) em dias alternados, por um período de 9 dias. O OPG (puro) e a dexametasona (0,08 mg/orelha, controle positivo) foram administrados por via tópica durante 4 dias (2 vezes ao dia) a partir do 5º dia do experimento. O edema foi avaliado diariamente através de medição da espessura da orelha direita utilizando um paquímetro digital. No 9º dia do experimento, os animais foram sacrificados e em seguida com o perfurador de couro metálico, círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados para avaliação do edema (STANLEY et al., 1991).

Quantificação do edema

Buscando avaliar o percentual de inflamação em cada animal analisado, foram obtidos discos de 6 mm de diâmetro: um da orelha direita (tratado com óleo de cróton) e outro da orelha esquerda (tratado com o veículo do agente flogístico). Cada disco obtido teve sua massa determinada com a utilização de uma balança analítica (modelo Metler Toledo AB204). O edema de orelha, expresso em percentual de aumento da massa da orelha, foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

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

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

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

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

onde MPE_{trat} representa a média do percentual do edema do grupo submetido ao tratamento com OPG ou dexametasona (controle positivo) e MPE_{cont} a média do percentual de edema do grupo controle negativo (acetona ou salina).

Análise estatística dos dados

Os valores obtidos foram expressos em média e erro padrão da média (E.P.M.). Para os testes que possuem três ou mais grupos e uma única avaliação das amostras, as diferenças obtidas entre os grupos foram submetidas a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguindo-se do teste de Student-Newmann-Keuls. Nos ensaios que possuem três ou mais grupos, e cuja avaliação das amostras se deu em vários intervalos de tempo (edema provocado pela aplicação múltipla de óleo de cróton), as diferenças entre os grupos foram submetidas a ANOVA de duas vias, seguindo-se do teste de Bonferroni, considerando diferenças significativas valores de $p < 0,05$. As análises estatísticas e apresentação gráfica dos resultados foram realizadas utilizando o programa *GraphPad Prism* (versão 5.0).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ácidos graxos presentes no OPG

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) permitiu identificar 98,01% dos constituintes do óleo de *P. geoffroanus*. O óleo fixo deste quelônio apresentou uma porcentagem de 83,64% de ácidos graxos insaturados e 13,38% de ácidos graxos saturados, onde os componentes majoritários foram o ácido palmitoléico (58,39%) e o ácido oléico (15,70%) (Tabela 2, p. 50).

Segundo Pathak & Dey (1956), o alto teor de ácidos graxos insaturados, como o encontrado no óleo de *P. geoffroanus*, é mais comumente encontrado em quelônios de água salgada. Em estudo realizado por Ackman et al. (1971), os autores fizeram uma comparação entre a composição dos ácidos graxos presentes em 3 espécies de tartarugas marinhas e 6 espécies de tartarugas de água doce, onde apenas uma das espécies de água doce, a *Dermatemys mawi*, apresentou elevada quantidade de ácidos graxos insaturados (64,9%), condição esta justificada por a espécie obter os ácidos graxos insaturados através da dieta, sendo a única herbívora entre as espécies de tartarugas de água doce analisadas.

Mesmo sendo *P. geoffroanus* uma espécie predominantemente carnívora (MOLINA, 1991), frutos também são consumidos por este quelônio (FACHÍN-TERÁN et al., 1995). Assim, a inclusão de vegetais na sua dieta pode ser um indicativo para a grande quantidade de ácidos graxos insaturados presentes no OPG.

Tabela 2 – Ésteres metílicos identificados no óleo fixo da gordura corporal de *P. geoffroanus*.

Nome	Tr (min)	(%)
Ácido perlagônico	11,43	2,04
Ácido pentadecílico	19,09	3,68
Ácido palmitoléico*	22,31	58,39
Ácido caprílico	23,98	0,84
Ácido linoléico*	24,63	4,50
Ácido linolênico*	24,72	2.28
Ácido oléico*	24,83	15.70
Ácido erúxico*	24,90	3,76
Ácido palmítico	25,13	6,82
Ésteres saturados	-	13,38
Ésteres insaturados	-	84,63
Total	-	98.01

Tr (tempo de retenção); * ácidos graxos insaturados

Atividade antimicrobiana e moduladora de antibióticos do óleo de *P. geoffroanus*

No teste *in vitro* verificou-se que o óleo teve atividade inibitória frente a *C. krusei* ATCC 6258, com CIM 128µg/mL. Todavia, o óleo não apresentou atividade antimicrobiana em concentrações clinicamente relevantes frente às linhagens de *E. coli* ATCC 10532, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* ATCC 4362 e *C. albicans* ICB 12, com CIM \geq 1024 µg/mL para estes microrganismos (Tabela 3, p. 51).

Espécies de *Candida* são responsáveis por causar infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos e podem causar desde infecções superficiais até infecções sistêmicas (SHAO et al., 2007). As classes de antifúngicos apresentam baixa eficácia, alta toxicidade e frequentemente levam à resistência (ANDERSON, 2005). Diante disso, a busca por produtos naturais com atividade antifúngica frente a espécies de *Candida* vem sendo alvo de muitos estudos (GIORDANI et al., 2004; DUARTE et al., 2005).

Tabela 3 – Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) do óleo fixo de *P. geoffroanus* frente à microrganismos padrões e multirresistentes.

Microorganismos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
	<i>P. geoffroanus</i>
<i>E. coli</i> ATCC 10532	≥ 1024
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	≥ 1024
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 4362	≥ 1024
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	≥ 1024
<i>C. albicans</i> ICB 12	≥ 1024
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	128

Ácidos graxos são conhecidos por possuírem propriedades antibacterianas e antifúngicas (AGARAMOOTRHY et al., 2007). Em estudo recente, Silva et al. (2011) demonstraram que ácidos graxos de Rã-touro (*Rana catesbiana*) apresentaram atividade antifúngica frente as linhagens de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*. Em outro estudo, Bergsson et al. (2001) também demonstraram que ácidos graxos apresentaram atividade para linhagens de *Candida albicans*, onde os mesmos destruíram estes microrganismos através da ruptura ou desintegração das suas membranas plasmáticas.

Nossos resultados indicam que o óleo apresentou eficiência do ponto de vista clínico frente a *C. krusei* ATCC 6258, sendo este o primeiro relato de atividade antifúngica do óleo de *P. geoffroanus*.

Na atividade modificadora de antibióticos evidenciamos uma ausência de atividade inibitória quando combinamos o OPG com os aminoglicosídeos frente às linhagens de *S. aureus* 358 e *E. coli* 27. Todavia, efeito sinérgico foi observado na associação do OPG com a gentamicina frente à cepa de *P. aeruginosa* 22 (Tabela 4, p. 52). Na modulação dos antifúngicos, o OPG não demonstrou atividade clinicamente relevante, com CIM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ frente às linhagens de *C. albicans* ICB 12 e *C. krusei* 6258.

Tabela 4 – Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) de aminoglicosídeos na ausência e na presença de 128 $\mu\text{g/mL}$ do óleo de *P. geoffroanus* frente *Escherichia coli* 27(EC 27), *Staphylococcus aureus* 358 (SA 358) e *Pseudomonas aeruginosa* 22 (PA 22).

Antibióticos	EC 27		SA 358		PA 22	
	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM
	Combinado		Combinado		Combinado	
Amicacina	4,9	4,9	19,5	19,5	312,5	312,5
Neomicina	4,9	4,9	19,5	19,5	312,5	312,5
Gentamicina	2,44	2,44	9,8	9,8	39,1	9,8

Outros trabalhos demonstraram a ação antimicrobiana de produtos naturais oriundos de répteis. Falodun et al. (2008) e Ferreira et al. (2011) mostraram que a gordura da serpente *Boa constrictor* possui atividade antibacteriana e moduladora de antibióticos, respectivamente. Porém, nos dois estudos, apenas Falodun et al. (2008) buscaram avaliar a atividade antifúngica, onde a gordura deste réptil não foi capaz de inibir o crescimento de *C. albicans*.

A associação de produtos naturais a medicamentos industrializados vem sendo documentada na literatura científica. Podemos citar como exemplos os relatos de Calvet-Mir et al. (2008), que relataram a associação de produtos da medicina tradicional da etnia Tsimane (que habitam as províncias Ballivian e Yacuma, na Bolívia) à medicina ocidental para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, e os de Vandebroek et al., (2008), que documentaram a combinação de produtos naturais e medicamentos industrializados para o tratamento de doenças dos tratos respiratório e digestório na comunidade rural de Quechua, na Bolívia. Os ácidos graxos podem demonstrar atividade antibacteriana, principalmente os insaturados, por afetarem a síntese endógena dos ácidos graxos bacterianos (ZHENG et al., 2005). A concentração de ácidos graxos insaturados no OPG é de 84,63%.

Os resultados obtidos indicam que o óleo de *P. geoffroanus* demonstrou possuir atividade antimicrobiana quando sozinho ou associado a antibióticos, sugerindo poder vir a representar um interessante produto no tratamento de infecções causadas por fungos e bactérias.

ATIVIDADE DO ÓLEO FIXO DE *P. Geoffroanus* ATRAVÉS DOS MODELOS DE INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

Edema de orelha induzido por aplicação única do óleo de cróton

A Figura 4 (p. 53) e a Tabela 5 (p. 54) mostraram que o OPG puro não apresentou efeito antiedematogênico após 6 horas de aplicação tópica do óleo de cróton, quando comparado com o grupo tratado com acetona (controle negativo). Apenas o grupo tratado com a dexametasona (0,08 mg/orelha) demonstrou redução significativa quando comparado ao controle negativo, com efeito inibitório médio da inflamação de 65,08% ($p < 0,001$).

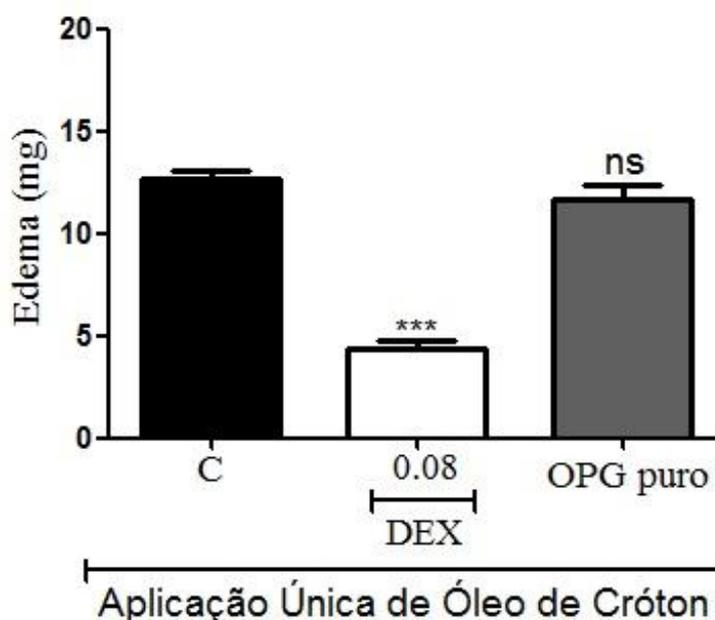


Figura 4 – Efeito do OPG puro administrado topicamente nas orelhas de camundongos induzidos pela aplicação única do óleo de cróton. Os animais foram previamente tratados com o controle acetona (C), dexametasona 0,08 mg/orelha (DEX) e OPG puro. Após 15 minutos receberam topicamente óleo de cróton 5% (v/v) em acetona. O gráfico representa a média do edema de orelha (%) e as barras verticais o E.P.M. de 6 animais registrados ao final de 6 horas de aplicação tópica do óleo de cróton. *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e Teste de Student – Newman – Keuls).

Tabela 5 – Efeito do OPG sobre o edema induzido pela aplicação única de óleo de cróton.

Grupo	Dose (mg/mL)	Edema (mg)	Inibição (%)
Controle Negativo	–	12,6 ± 0,47	–
Dexametasona	8	4,4 ± 0,4 ^{***}	65,08%
OPG	Puro	11,7 ± 0,64	7,14%

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

Uma estratégia útil no desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais é, justamente, utilizar o vasto conhecimento popular em relação ao uso de plantas e produtos de origem animal em diversas enfermidades, pois este tipo de informação permite guiar a química de produtos na busca de novos agentes terapêuticos. Muitos dos medicamentos atualmente disponíveis no mercado que são derivados de produtos naturais provêm desta informação, definida como informação etnofarmacológica (CLARK, 2002). Na literatura, trabalhos citam que répteis como *Tupinambis merianae*, *Caudisona durissa*, *Boa constrictor* e *P. geoffroanus* vem sendo usado para o tratamento de diversas doenças (ex: feridas, reumatismo, asma, inflamação de garganta) que podem estar associadas a processos patológicos de origem inflamatória (ALVES et al., 2009; ALVES & ALVES, 2011).

Diversos modelos experimentais de inflamação podem ser utilizados para avaliar a atividade anti-inflamatória de drogas. No presente estudo foi analisado o possível efeito antiedematogênico do OPG por meio de modelos experimentais de inflamação aguda e crônica, induzidos por óleo de cróton em camundongos. O modelo de edema de orelha é bastante útil na avaliação da atividade anti-inflamatória de compostos, uma vez que é uma metodologia bastante simples e que permite verificar a atividade de compostos no edema induzido por diferentes agentes irritantes, e ainda identificar compostos que tenham a capacidade de penetrar na pele (GABOR, 2000). Também é um modelo bem estabelecido para a investigação dos efeitos de compostos anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais (TOWBIN, 1995). Fármacos inibidores das COX e 5-LOX, antagonistas de LTB₄, inibidores seletivos de iNOS e corticosteróides

podem demonstrar ação anti-inflamatória tópica, com redução significativa do edema em modelos animais de inflamação cutânea induzido por óleo de cróton (MURAKAWA et al, 2006; MEDEIROS et al, 2009).

O agente flogístico óleo de cróton, extraído das sementes de *Croton tiglium*, tem como constituinte majoritário o 13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol (TPA) (LAPA, 2003). Estudos afirmam que a inflamação aguda induzida pela aplicação tópica do TPA ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, resultando em migração de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), liberação de histamina e serotonina, além de moderada síntese de eicosanoides (6-ceto-PGF_{1α}, PGE₂ e LTB₄) (PUNGERÓ et al., 1998.; BADILLA et al., 2007). O mecanismo pelo qual o TPA exerce seu efeito é devido à ativação da proteína quinase C (PKC), bem como da ativação sequencial da via MAP quinase (MAPK), fosfolipase A₂ (PLA₂), indução da expressão da COX-2 e translocação/ativação da LOX, que por sua vez culmina na síntese e liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios responsáveis pela formação do edema, migração de leucócitos para a derme e hiperproliferação celular, sendo estas as características da resposta inflamatória induzida pela aplicação tópica do TPA (MURAKAWA et al., 2006; DE BERNARDIS et al., 1994). O TPA também parece induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em queratinócitos da pele, desencadeando o processo inflamatório (WILMER et al., 1994; REDONDO et al., 1997).

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

Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

Conforme demonstrado na Figura 5 (p. 56), Figura 6 (p. 57) e a Tabela 6 (p. 57), a aplicação tópica do OPG puro (2 vezes ao dia, durante 4 dias) nas orelhas dos camundongos promoveu uma significativa redução em relação ao controle negativo. O

controle negativo apresentou um edema de $17,0 \pm 1,39$ mg. A dexametasona, e o OPG demonstraram diminuição significativa de $6,4 \pm 1,12$ mg ($p < 0,001$), $10,8 \pm 1,22$ mg ($p < 0,01$), respectivamente com um percentual de inibição de 62,35 % para dexametasona, 32,47 % para o OPG.

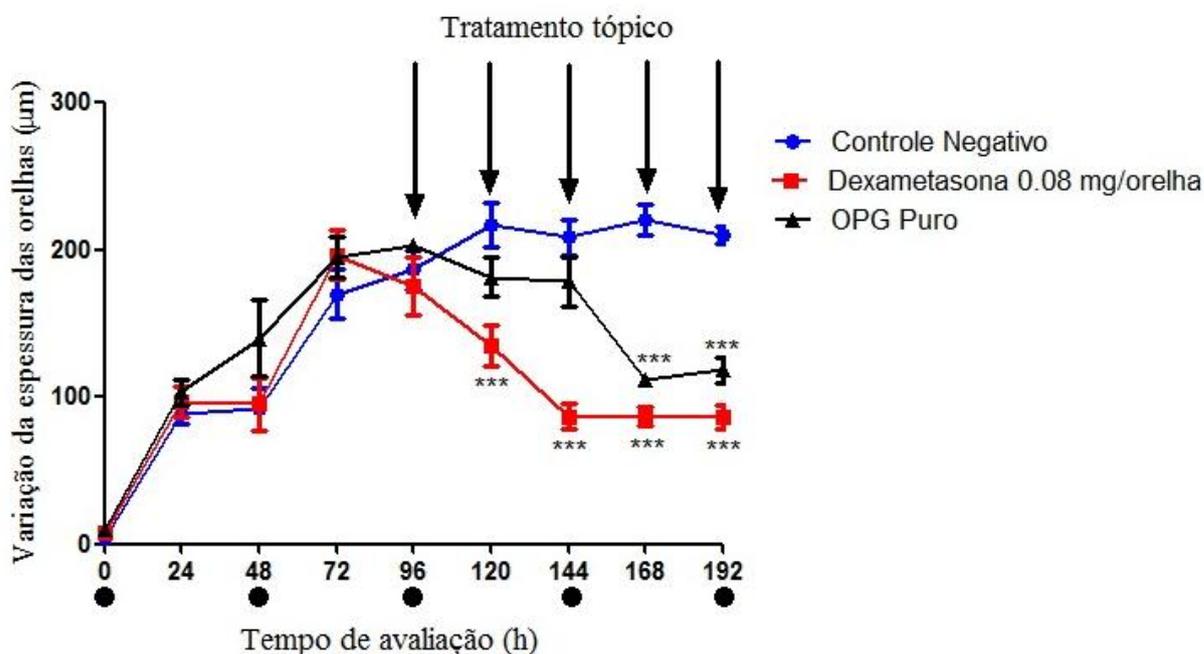


Figura 5 – curvas tempo-resposta do efeito do tratamento com OPG puro no modelo de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos. O experimento foi conduzido por 9 dias. Os animais receberam óleo de cróton em acetona na orelha direita em dias alternados, indicados por pontos pretos, e o veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha (μm) foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação do OC), a orelha dos animais recebeu veículo salina, dexametasona (DEX) e OPG bruto ($20\mu\text{L}$, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 3 dias seguintes (as setas indicam os dias em que houveram tratamento). O efeito anti edematogênico dos compostos foi verificado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais, e as barras verticais o E.P.M. (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ vs veículo (ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Bonferroni).

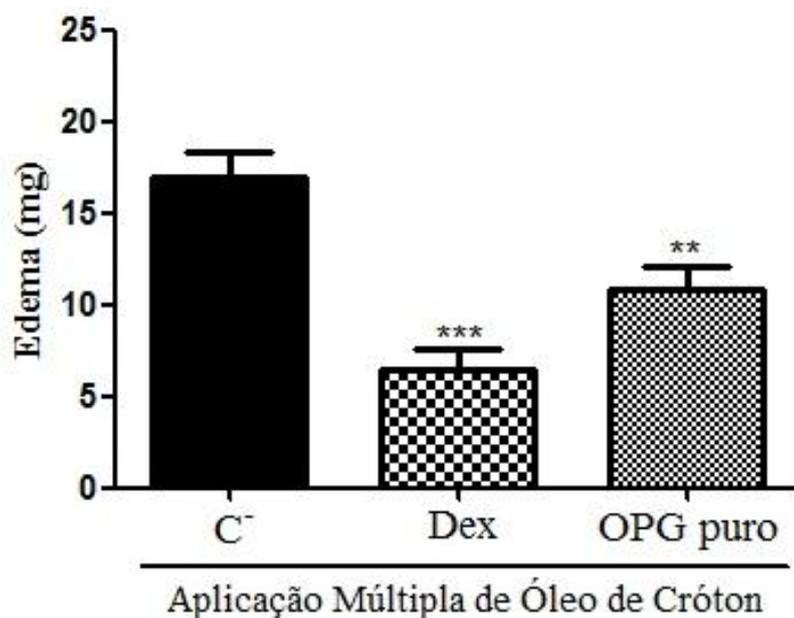


Figura 6 – Efeito do OPG administrado topicamente nas orelhas de camundongos induzidos pela aplicação múltipla do óleo de cróton. A aplicação do óleo de cróton foi realizada em dias alternados, por um período de 9 dias. A partir do 5º dia as orelhas direitas dos camundongos receberam acetona (C), dexametasona 0,08 mg/orelha e OPG puro 2 vezes ao dia. O gráfico abaixo representa a média do edema de orelha (%), e as barras verticais, o E.P.M. de oito animais que foram utilizados neste teste de administração múltipla do óleo de cróton. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs controle (ANOVA e Teste de Student – Newman – Keuls).

Tabela 6 – Efeito do OPG sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla do óleo de cróton.

Grupo	Dose (mg/mL)	Edema (mg)	Inibição (%)
Controle Negativo	–	17,0 ± 1,37	–
Dexametasona	8	6,4 ± 1,12 ^{***}	62,35%
OPG	Puro	10,8 ± 1,22 ^{**}	36,47%

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

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

Por meio do modelo de edema crônico provocado pelo óleo de cróton foi observado que o OPG promoveu a diminuição das espessuras das orelhas 168 horas após o início do teste, reduzindo o percentual do edema até o último dia do experimento (Figura 5, p. 55). A atividade anti-inflamatória de produtos naturais oriundos de animais vem sendo comprovada em alguns estudos (FALODUN et al., 2008; ABREU, 2008 e MARTINS et al., 2011).

Alguns dos ácidos graxos identificados no OPG são citados na literatura como possuidores de propriedades anti-inflamatórias. O ácido linoléico aplicado topicamente possui grande capacidade de ser absorvido pelo estrato córneo, podendo em cinco dias, restaurar a pele humana com vários distúrbios dermatológicos (LONE & STOUGHTON, 1977). O óleo de prímula (*Oenothera bienis L.*), borago (*Borago officinalis L.*) e tulase (*Ocimum sanctum L.*), ricos em ácido α -linolênico e γ -linolênico, demonstraram efeitos antiinflamatório em modelos animais (SINGH et al., 1996;). Em estudo realizado por Cardoso et al. (2004), foi avaliada a influência da administração tópica dos ácidos α -linolênico (n-3), linoléico (n-6) e oléico (n-9) no processo de cicatrização de feridas de ratos. Os autores observaram que animais tratados topicamente com o ácido oléico e ácido linoléico apresentaram redução significativa da área do ferimento a partir do quinto dia de tratamento e inibição da produção de óxido nítrico local, nas primeiras 48 horas pós-cirúrgica. Neste estudo foi sugerido um potencial terapêutico importante dos ácidos linoléico e oléico no processo de cicatrização.

Tomando como base o conhecimento dos ácidos graxos presentes no OPG (Tabela 2, p. 49), há um indicativo que os ácidos: linolênico, linoléico e oléico podem estar envolvidos na diminuição do edema produzido pelo óleo de cróton.

Após a realização dos testes observamos que os dados e resultados apresentados são promissores sobre as atividades antibacteriana e anti-inflamatória, e poderão incentivar futuras pesquisas *in vivo* e *in vitro* sobre os aspectos químicos e farmacológicos do óleo fixo da gordura de *P. Geoffroanus*.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

1. O óleo de *P. geoffroanus* apresentou uma maior proporção de ácidos graxos insaturados que a de ácidos graxos saturados.
2. Os resultados dos testes microbiológicos indicam que o OPG, quando analisado isoladamente frente às cepas de fungos e bactérias testadas, apresentou atividade antifúngica do ponto de vista clínico para *Candida krusei* ATCC 6258.
3. O OPG quando combinado com antibacterianos e antifúngicos demonstrou atividade sinérgica para *Pseudomonas aeruginosa* (PA 22) quando associado à gentamicina.
4. A administração tópica do OPG diminuiu a atividade edematogênica induzida por aplicação múltipla do óleo de cróton.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABREU, A.P.L. **Estudo comparativo da atividade anti-inflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde**. Dissertação de mestrado profissional em Farmacologia Clínica. Universidade Federal do Ceará, 2008.

ACKMAN, R.G.; HOOPER, S.N.; FRAIR, W. Comparison of the fatty acid compositions of depot fats from fresh-water and marine turtle. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 40 B, p. 931-944, 1971.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/ Quadrupole Mass Spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.

AGORAMOOTRHY, G.; CHANDRASEKARAN, M.; VENKATESALU, V.; HSU, M.J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 739-742, 2007.

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; NURIT, K.; BASÍLIO, I.J.L.D; COELHO, V.P.M. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383-395, 2006.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A. Kovats indices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, v. 47, p. 890-892, 1984.

ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M. I. L. Kovats índices simulation in essential oils analysis. **Química Nova**, v. 13, p. 282-284, 1990.

ALLABY, M. **Animals: from mythology to zoology**. New York. Facts On File, Inc, 2010.

ALMEIDA, A.V. **Prescrições zoterápicas indígenas brasileiras nas obras de guilherme Piso (1611-1679)**. In: atualidades em Etnobiologia e Etnoecologia, p. 47-60.

ALVES, A.G.C.; LUCENA, R.E.P.; ALBUQUERQUE, U.P. Nupeea, 2005.

ALMEIDA, A.V.; Zooterapia indígena brasileira do século XVII nas obras de Guilherme Piso, Georg Marcgrave e Joannes de Laet, **Sitientibus**, v. 7, p. 261-272, 2007.

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

ALVES, A.G.; SOUTO, F.J.B.; LEITE, A.M. Etnoecologia dos cágados-d'água *Phrynops spp.* (Testudinomorpha: Chelidae) entre pescadores artesanais do Açude Bodocongó, Campina Grande, Paraíba, Nordeste do Brasil. **Sitientibus**, v. 2, p. 62-68, 2002.

ALVES, R.R.N. Fauna used in popular medicine in Northeast Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p. 1-7, 2009.

ALVES, R.R.N.; ALVES, H.N. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, p. 9, 2011.

ALVES, R.R.N.; ROSA, I.L. Why study the use of animals products in traditional medicine? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 1, p. 1-5, 2005.

ALVES, R.R.N.; ROSA, I.L. from cnidarians to mammals : the use of animal as remedies in fishing communities in NE brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 259-276, 2006.

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

ALVES, R.R.N.; ROSA, I.L. Zootherapeutic practices among fishing communités in North and Northeast Brazil: A comparison. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 82-103, 2007b.

ALVES, R.R.N.; ROSA, I.L.; SANTANA, G.G. The role of animal-derived remedies as complementary medicine in Brazil. **BioScience**, v. 57, p. 949-955, 2007.

ALVES, R.R.N.; LIMA, H.N.; TAVARES, M.C.; SOUTO, W.M.S.; BARBOZA, R.R.D.; VASCONCELOS, A. Animal-based remedies as complementary medicines in Santa Cruz do Capibaribe, Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, p. 1-9, 2008a.

ALVES, R.R.N.; VIEIRA, W.L.S.; SANTANA, G.G. Reptiles used in traditional folk medicine: conservation implications. **Biodiversity Conservation**, v. 17, p. 2037-2049, 2008b.

ALVES, R.R.N.; LÉO-NETO, N.A.L.; BROOKS, S.E.; ALBUQUERQUE, U.P.. Commercialization of animal-derived remedies as complementary medicine in the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 104, p. 600-608, 2009a.

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

ALVES, R.R.N.; LÉO-NETO, N.A.; SANTANA, G.G.; VIEIRA, W.L.S.; ALMEIDA, W.O. Reptiles used for medicinal and magic religious purposes in Brazil. **Applied Herpetology**, v. 6, p. 257-274, 2009c.

ALVES, R.R.N.; NOGUEIRA, E.; ARAÚJO, H.; BROOKS, S. Bird-keeping in the Caatinga, NE Brazil. **Human Ecology**, v. 38, p. 147-156, 2010.

ALVES, R.R.N.; PEREIRA-FILHO, G.A. Commercialization and use of snakes on North and Northeastern Brazil: implications for conservation and management. **Biodiversity Conservation**, v. 16, p. 969-985, 2007.

ALVES, R.R.N.; SANTANA, G.G. Use and commercialization of *Podocnemis expansa* (Schewiger, 1812) (Testudines: Podocnemididae) for medicinal purposes in two communities in North of Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, p. 1-6, 2008.

ALVES, R.R.N.; SOUTO, W.M.S. Etnozoologia: conceitos, considerações históricas e importância. ALVES, R.R.N.; SOUTO, W.M.S. In: **A Etnozoologia no Brasil: importância, status atual e perspectivas**. Nupeea. 2010.

ALVES, R.R.N.; SOUTO, W.M.S. Ethnzoology in Brazil: current status and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, p. 2-18, 2011.

ANDERSON, J.B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 547-556, 2005.

ANDRADE, J.N.; COSTA-NETO, E.M. Primeiro registro da utilização medicinal de recursos pesqueiros na cidade de São Félix, Estado da Bahia, Brasil. **Acta Science Biological Science**, v. 27, p. 177-183, 2005.

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

ANDRADE, P.M.M.; CARMO, M.G.T. Ácidos graxos n-3: um link entre eicosanoides, inflamação e imunidade. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 8, p. 135-143, 2006.

ANYINAM, C. Ecology and ethnomedicine: exploring links between current environmental crisis and indigenous medical practices. **Social Science and Medicine**, v. 40, p. 321-329, 1995.

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

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

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

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

BEGOSSI, A.; SILVANO, R.A.M.; AMARAL, B.D.; OYAKAMA, O.T. Uses of Fish and Game by Inhabitants of an Extractive Reserve (Upper Juruá, Acre, Brazil). **Environment, Development and Sustainability**, v. 1, p. 73-93. 1999.

BELLINGHINI, R.H. Brasil: **Laboratórios redescobrem a pesquisa**. O Estado de São Paulo, 15 de fevereiro de 2004.

BENOIT-VICAL, F.; GRELLIER, P.; ABDOULAYE, A.; MOUSSA, I.; OUSMANE, A.; BERRY, A. In vitro and in vivo Antiplasmodial Activity of *Mormodica balsamina* Alone or in a Traditional Mixture. **Chemotherapy**, v. 52, p. 288-292. 2006.

BERGSSON, G.; ARNFINNSSON, J.; STEINGRI'MSSON, L.; THOMAR, H. *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, p. 3209-3212, 2001.

BIERLEIN, J.F. **Mitos Paralelos**. Ediouro, Rio de Janeiro, p. 95-96, 2004.

BROWN-SÉQUARD, C.E. Société de Biologie, Séance Du 18 mars. **Archives de physiologie normale et pathologique**, p. 192, 1893.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **Lipids**, v. 36, p. 1007-1024, 2003.

CALVET-MIR, L.; REYES-GARCIA.; TANNER, S. Is there a divide between local medicinal knowledge and Western medicine? A case study among native Amazonians in Bolivia, **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, p. 18, 2008.

CAMARGO, M. **Garrafada**. Rio de Janeiro, Ministério da Educação e Cultura. 1875.

CARMO, M.C.N.S. ; CORREIA, M.I.T.D. A importância dos ácidos graxos ômega-3 no câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 55, p. 279-287, 2009.

CARDOSO, T.A.O. Considerações sobre a biossegurança em arquitetura de biotérios. **Boletim Central Panamaense Fiebre Aftosa**, v. 64, p. 3-17, 1998–2001.

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

CHEMAS, R.C.. **A zooterapia no âmbito da medicina civilizada: organoterapia humana e animal *stricto sensu***. COSTA-NETO, E.M.; ALVES, R.R.N. In: Zooterapia: os animais na medicina popular brasileira. Nupeea, 2010.

CLARK, A. **Natural products**. WILLIAMS, D.; LEMKE, T.L. In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

COSTA-NETO, E.M. **Etnoictiologia alagoana, com ênfase na utilização medicinal de insetos**. Monografia. Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 192p, 1994.

COSTA-NETO, E.M. Faunistic resources used as medicines by an Afro-Brazilian community from Chapada Diamantina National Park, State of Bahia, Brazil. **Sitientibus**, v. 15, p. 211-219, 1996.

COSTA-NETO, E.M. **“Barata é um santo remédio” introdução a zooterapia popular no estado da Bahia**. Editora da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 103p, 1999.

COSTA-NETO, E.M.; ALVES, R.R.N. **Estado da arte da zooterapia popular no Brasil**. COSTA-NETO, E.M.; ALVES, R.R.N. In: Zooterapia: os animais na medicina popular brasileira. Nupeea, 2010.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

COUTINHO, H.D.M.; VASCONCELLOS, A.; LIMA, M.A.; ALMEIDA-FILHO, G.G.; ALVES, R.R.N. Termite usage associated with antibiotic therapy: enhancement of aminoglycosides antibiotic activity by natural products of *Nasutitermes corniger* (Motschulsky, 1855). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 35, 2009.

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

DE BERNADIS, L.; LEONARDI, G.; CARUSO, A.; CUTULI, V.M.; ARNICO-ROXAS, M. protective effects of papaverine salicylate in mouse ear dermatitis and PAF-induced rar paw edema. **Agents Actions**, v. 42, p. 29-33, 1994.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.L.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

FACHÍN-TERÁN, A, R.C.; VOGT, R.C.; GOMEZ, M.F.S. Habits of an assemblage of five species of turtles in the Rio Guaporé, Rondônia, brazil, **Journal of Herpetology**, v. 29, p. 536-547, 1995.

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

FERREIRA, S.H. A descoberta acadêmica e os direitos de propriedade intelectual. **Ciência Hoje**, p. 43-44, 1993.

FERREIRA, F.S., BRITO, S.V., RIBEIRO, S.C., ALMEIDA, W.O., ALVES, R.R.N. Zootherapeutics utilized by residents of the community Poço Dantas, Crato-CE, Brazil. **Journal Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p. 21 – 31, 2009a.

FERREIRA, F.S., BRITO, S.V., RIBEIRO, S.C., SARAIVA, A.A.F., ALMEIDA, W.O., ALVES, R.R.N., 2009b. Animal-based folk remedies sold in public markets in Crato and Juazeiro do Norte, Ceará, Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 9, p. 17 – 24, 2009b.

FERREIRA, F.S.; BRITO, S.V.; SARAIVA, R.A.; ARARUNA, M.K.A.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; ALMEIDA.; ALVES, R.R.N. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 514-520, 2010.

FERREIRA, F.S.; SILVA, N.L.G.; MATIAS, E.F.F.; BRITO, S.V.; OLIVEIRA, F.G.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M.; ALMEIDA, W.O.; ALVES, R.R.N. Potentiation of amonoglycoside antibiotic activity using the body fat from the snake *Boa constrictor*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 503-509, 2011.

FERREIRA, F.S.; ALBUQUERQUE, U.P.; COUTINHO, H.D.M.; ALMEIDA, W.O.; ALVES, R.R.N. the trade in medicinal animals in northeastern brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-20, 2012.

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

FOSTER, G.M. **Introduction a l'ethnomédecine**. Pp. 17-24. In: BANNERMAN, R.H., J. BURTON & C. WEN-CHIEN (ed.). *Médecine traditionnelle et couverture des soins de santé*. Genebra, OMS, 1983.

FOSTER. M.S.; JAMES, S.R. Dogs, Deer, or Guanacos: Zoomorphic Figurines from Pueblo Grande, Central Arizona. **Journal of Field Archaeology**, v. 29, p. 165-176, 2002.

FRANKE, J.; TELECKY, T.M. **reptiles as pets: an examination of the trade in live reptiles in the United States**. Washington (DC). Humane Society of the United States, 2001.

FRAZIER, J. Sustainable use of wildelife: The view from archaeology. **Journal of Nature Conservation**, v. 15, p. 163-173. 2007.

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

GIBBONS, J.W.; SCOTT, D.E.; RYAN, T.J.; BUHLMANN, T.D.; TUBERVILLE, B.S.; METTS, J.L.; GREENE, T.M.; LEIDEN, Y.; POPPY, S.; WINNE, C.T. The global decline of reptiles déjà vu amphibians. **BioScience**, v. 50, p. 653-666, 2000.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAIL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 990-995, 2004.

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

HANAZAKI, N.; ALVES, R.; BEGOSSI, A. Hunting and use of terrestrial fauna used by Caicarás from the Atlantic Forest coast (Brazil). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 5, p. 1-36. 2009.

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

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

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

HOOVER, C. **The US role in the international live reptile trade: Amazon tree boas to Zululand dwarf chameleons.** TRAFFIC North America, 1998.

IVERSON, J.B. **A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the world.** Richard Privately printed. 363p., 1992.

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

JOHANNES, R.E. Integrating traditional ecological knowledge and management with environmental impact assessment. In: J.T. Inglis (ed.). **Traditional Ecological Knowledge: Concepts and Cases.** Ottawa, Canada, International Program on Traditional Ecological Knowledge and International Development Research Centre, p. 33-39, 1993.

KUNIN, W.E.; LAWTON, J.H. **Does biodiversity matter? Evaluating the case for conserving species.** p. 283-308. In: Gaston, K.J. (ed.). *Biodiversity: a biology of numbers and difference.* Oxford, Black Science, 1996.

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

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

LEES, P.; LANDONI, M.F.; GIRAUDEL, J.; TOUTAIN, P.L. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary

interest. **Journal Veterinary of Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, p. 479-490, 2004.

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

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

LONE, N.J.; STOUGHTON, R.B. Essential fatty acid deficient hairless mouse: a modelo of chronic epidermal hyperproliferation. **The British Journal Dermatology**, v. 96, p. 155-162, 1977.

MAHAWAR, M.M.; JAROLI, D.P. Animals and their products utilized as medicine by the inhabitants surrounding the Ranthambhore National Park, India. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 2, p. 1-5, 2006.

MAHAWAR, M.M.; JAROLI, D.P. Traditional zootherapeutic studies in India: a review. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 4, p. 1-12, 2008.

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

MARQUES, J.G.W. **Pescando Pescadores: etnoecologia abrangente no baixo São Francisco alagoano**. NUPAUB, São Paulo, 285p, 1995.

MARQUES, J.G.W. **A fauna medicinal dos índios Kuna de San Blás (Panamá) e a hipótese da universalidade zooterápica**. In: Anais da 46ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Vitória, 1994.

MARTINS, M.; MAIA FILHO, A.L.M.; COSTA, C.L.S.; COELHO, N.P.M.F.; COSTA, M.S.; CARVALHO, R.A. Anti-inflammatory action of the *Ovis Áries* lipidic

fraction associated to therapeutic ultrasound in an experimental model of tendinitis in rats (*Rattus norvegicus*), **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 15, p. 297-302, 2011.

MBWAMBO, Z.H.; MOSHI, M.J.; MASIMBA, P.J.; KAPINGU, M.C.; NONDO, R.S. Antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of extracts of Terminalia brownie roots and stem. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, 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.

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.

MELO, A.S.A.F. **A zooterapia popular e seus aspectos comerciais no município de Feira de Santana, Bahia**. Monografia do Curso de Especialização em Zoologia, Universidade Estadual de Feira de Santana. 1999.

MOLINA, F.B. Observações sobre os hábitos e o comportamento alimentar de *Phrynops geoffroanus* (SCHWEIGGER, 1812) em cativeiro (REPTILIA, TESTUDINES, CHELIDAE). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 7, p. 319-326, 1991.

MORIN-LABATUT, G.; AKATAR, S. Traditional Knowledge: a resource to manage and share. **Development**, v. 4, p. 24-30, 1992.

MOURA, F.B.P; MARQUES, J.G.W. Zooterapia popular na Chapada Diamantina: uma medicina incidental? **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, (Sup 2), p. 2179-2188, 2008.

MOUSSON-LANAUZE (Dr.). **A travers L'opothérapie**. Paris, Laboratoires Couturieux, 1925.

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.

NABAS, F.; CONESINI, F.J.; MENIN, S.E.A.; ANTÔNIO, M.A.; BIGHITTI, A.E.; ARAÚJO, C.E.P.; CARVALHO, P.O. Antiedematous effects of oils containing the fatty acids Omega-3 and 6 in mice. **Revista Brasileira de medicina**, v. 66, p. 92-96, 2009.

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

NGOKWEY, N. Home remedies and doctors' remedies in Feira (Brazil). **Social Science and Medicine**, v. 40, p. 1141-1153, 1995.

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

PATHAK, S.P.; DEY, L.M. The fatty acid composition of indian turtle fat. **Biochemical Journal**, v. 62, p. 448-451, 1956.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. **Inflamação**. BRASILEIRO-FILHO.; PEREIRA, F.E.L.; PITTELLA, J.E.H.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, A.J.A. In: Patologia Geral, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1993.

PEREIRA, G.K.; SOUTO, F.J.B. **Uma abordagem etnoecologica da utilização de animais na medicina popular na comunidade pesqueira de Acupe, Santo Amaro, Bahia**. In: Encontro Baiano de Etnobiologia e Etnoecologia (Resumos), Universidade Estadual de Feira de Santana, p. 181-190, 1999.

PINA, L. **Flora e fauna brasílicas nos antigos livros médicos portugueses**. Brasília, v. 3, p. 149-357, 1946.

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

POUGH, F. H.; HEISER, J.B.; McFARLAND, W. N. **A Vida dos Vertebrados**, 2 ed, são Paulo: Editora Atheneu, p. 356, 1999.

PRITCHARD, P.C.H; TREBBAU, P. **The turtles of Venezuela**. Oxford, Society for Study of Amphibians & Reptiles, 403p., 1984.

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

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

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

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

RIBEIRO, D. **O processo civilizatório: etapas da evolução sociocultural**. Editora Companhia das Letras. 1998.

RIST, S.; DAHDOUH-GABAS, F. Ethnoscience – A step towards the integration of scientific and indigenous forms of knowledge in the management of natural resources for the future. *Environment, Development and Sustainability*, v. 8, p. 467-493, 2006.

ROBLEJO, L.Y.L.; DELGADO, D.L. Las incretinas: nueva alternativa terapéutica para el control de glucometabólico de La diabetes melitus tipo 2. *MEDISAN*, v.16, 2012.

ROCK, K.L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. *Annual review of pathology*, v. 3, p. 99-126, 2008.

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

RUEDA-ALMONACID, J.V.; CARR, J.L.; MITTERMEIER, R.A.; RODRIGUES-MAHECHA, J.V.; MAST, R.B.; VOGT, R.C.; RODIN, A.G.J.; OSSA-VELASQUEZ, J.; RUEDA, J.N.; MITTERMEIER, C.G. **Las tortugas e los crocodilianos de los países andinos del trópico**. Bogotá: Conservación Internacional, 537p., 2007.

SANTOS, I.J.M.; MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; BRAGA, M.F.B.M.; ANDRADE, J.C.; SOUZA, T.M.; SANTOS, F.A.V.; SOUSA, A.C.A.; COSTA, J.G.M.; MENEZES, I.R.A.; ALVES, R.R.N.; ALMEIDA, W.O.; COUTINHO, H.D.M. Evaluation of antimicrobial activity of decoction of *Tropidurus hispidus* (Spix, 1825) and *Tropidurus semitaeniatus* (Spix, 1825) used by the traditional medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, p. 1-6, 2012.

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

SCHWABE, C.W. Animals in the ancient world. Pp. 36. In: A. Manning & J. Serpell (eds.). **Animals and human society: changing perspectives**. London, UK/ New York, USA, Routledge, 1994.

SHAO, P.L.; HUANG, L.M.; HSUEH, P.R. Recent advances and challenges in the treatment of invasive fungal infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 487-495, 2007.

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

SILLITOE, P. The development of indigenous knowledge. **Current Anthropology**, v. 39, p. 223-252. 1998.

SILVA, M.L.V.; ALVES, A.G.C.; ALMEIDA, A.V. A zooterapia no Recife (Pernambuco): uma articulação entre as práticas e a história. **Biotemas**, v. 17, p. 95-116, 2004.

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

SOUTO, W.M.S.; MOURÃO, J.S.; BARBOSA, R.R.D.; ALVES, R.R.N. Parallels between zootherapeutic practices in ethnoveterinary and human complementary medicine in northeastern Brazil, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 753-767, 2011.

SOUTO, W.M.S.; BARBOZA, R.R.D.; ROCHA, M.S.P.; ALVES, R.R.N.; MOURÃO, J.S. Animal-based medicines used in ethnoveterinary practices in the semi-arid region of Northeastern Brazil, **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 669-678, 2012.

SOUZA, F.L. Uma revisão sobre padrões de atividade, reprodução e alimentação de cágados brasileiros (Testudines, Chelidae). **Phyllomedusa**, v.3, p. 15 – 27, 2004.

SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

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

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

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

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6ª ed. São Paulo: Editora Roca, 2002.

TOWBIN, H.; PIGNAT, W.; WEIESENBERG, I. Time dependent cytokine production in the croton oil-induced mouse ear oedema. **Inflammation Research**, v. 44, p. 160-161, 1995.

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

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

VÁZQUEZ, P.E.; MÉNDEZ, R.M.; GUIASCÓN, O.G.R.; PIÑERA, E.J.N. Uso medicinal de la fauna Silvestre en los altos de Chiapas, México. **Interciencia**, v. 31, p. 491-499, 2006.

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

VOGT, R.C. **Tartarugas da Amazônia**. Lima, 104p., 2008.

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.

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibition: a double-edge sword? **Pharmacological Sciences**, v. 28, p. 459-464, 2007.

ZHENG, C.J.; YOO, J-S.; LEE, T-G.; CHO, H-Y.; KIM, W-G.; Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids. **FEBS Letters**, v. 579, p. 5157-5162, 2005.

ZHOU , Z.; JIANG, Z. International trade status and crisis for snake species in China. **Conservation Biology**, v. 18, p. 1386-1394, 2004.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – COMPROVANTE DE PARECER DO CEUA – URCA



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais

**PARECER DO RELATOR DA CEUA**

Processo n° 04/2012

Título do Projeto de Pesquisa: Estudo etnozoológico e experimental (microbiológico e farmacológico) do uso na medicina popular do cágado *Phrynops geoffroanus* (Schweigger, 1812) (Testudines) no Nordeste brasileiro.

Pesquisadores: Waltécio de Oliveira Almeida (Pesquisador Orientador)

Diógenes de Queiroz Dias (Pesquisador participante)

FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa

ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS:

Título Adequado Comentários

Objetivos Adequados Comentários

Introdução e Justificativa Adequadas Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

O PROJETO DESTA PESQUISA ESTA ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE: Adequado Comentários

INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de severidade: Leve Moderado Severo

Justifique:

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

Espécie: **Número Amostral:**

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais



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

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

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

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

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

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

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

Análise e Parecer do relator:

O presente projeto tem como finalidade comprovar o uso popular do óleo fixo proveniente da gordura de *Phrynops geoffroanus* para o tratamento de infecções e inflamações. Os estudos envolvendo produtos naturais de origem animal são escarços na literatura, portanto, o presente projeto apresenta relevância científica. Este projeto abrange também o conhecimento que poderá contribuir para o uso sustentável e para a conservação da espécie. O estado da arte atual presente neste trabalho levantará possibilidades para comprovar a eficácia do uso popular da espécie. A metodologia empregada é pertinente e, segundo o "Expert working group on severity classification of scientific procedures performed on animals" este procedimento é considerado de grau leve a moderado. O experimento será realizado usando um total de 180 camundongos (*Mus musculos*),



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI
Comissão de Experimentação e Uso de Animais



com média de peso entre 20-30g e divididos em 18 grupos diferentes. Os animais serão obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – CE e mantidos em regime ad libitum de água e ração, em ciclo claro e escuro de 12/12h. O experimento consiste no tratamento tópico do óleo fixo em diferentes concentrações em uso agudo e crônico segundo metodologia de Gabbor adaptada por Saraiva (2010) e sua influência no perfil anti-inflamatório induzido por diferentes agentes flogísticos. Observamos que o cronograma de execução do projeto é adequado para o alcance dos objetivos propostos.

RECOMENDAÇÃO FINAL:

- Aprovado
 Aprovado com recomendações
 Com Pendência
 Não aprovado

Crato, 30 de Maio de 2012.


Assinatura do Relator da CEUA