



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

**Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo
extraído da gordura corporal de *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae:
Ophidia) da Chapada do Araripe no Nordeste brasileiro**

OLGA PAIVA OLIVEIRA

CRATO, CE

2013

OLGA PAIVA OLIVEIRA

Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo extraído da gordura corporal de *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Ophidia) da Chapada do Araripe no Nordeste brasileiro

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

Orientador: Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida

CRATO, CE

2013

Esta dissertação foi submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular, e encontra-se disponível na Biblioteca da mesma Universidade

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

Olga Paiva Oliveira

Dissertação apresentada e aprovada em: 28/02/2013

Examinadores:

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

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

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

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

*À minha mãe, Maria Cleire Paiva, pelo apoio,
carinho e mimos, tão maiores e frequentes
quando mais intensas as dificuldades.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre presente no meu caminho, concedendo-me sabedoria e força necessária para a realização dessa conquista.

À minha mãe, Cleire Paiva, por ser porto seguro e fonte inesgotável de amor, carinho e compreensão. Exemplo de vida, de pessoa, responsabilidade, fidelidade, companheirismo... Por todas as dificuldades que ela enfrentou sempre nos envolvendo em seus braços, para que eles fossem escudos que não deixariam nenhum mal nos alcançar. Nela presencio diariamente como ser uma pessoa melhor, mesmo em pequenas atitudes e como é possível amar incondicionalmente. Diante de todas as conquistas da minha vida, nada nunca será tão grandioso quanto o fato de ter tido a honra de ser fruto de sua maternidade. Ao meu pai, Getúlio Oliveira pelo apoio e esforço pela minha formação escolar, me ensinando que o conhecimento adquirido é um bem que ninguém é capaz de tomar. Essa vitória também é de vocês!

À minha avó, Eva Maria da Silva, além do amor, carinho e incentivo, agradeço simplesmente por ela existir. Feliz eu já seria somente por tê-la. Por entender minha ausência, mesmo ligando só pra dizer: - Minha filha, você não veio ver voinha hoje? Vó, sua presença é essencial em minha vida, amo a senhora! Você é demais!

Aos meus irmãos Érica Paiva e Esdras Paiva pelo companheirismo de uma vida inteira. Sei que vocês torcem por mim e se realizam com as minhas vitórias tanto quanto eu pelas de vocês. Amo e admiro muito vocês!

Às minhas amadas crianças: meus sobrinhos Ana Chiara, Bernardo e Evinha e meus afilhados Rebeca e Ruy Filho pelo sorriso, um abraço, um carinho que me renovam as forças e adoçam o meu dia, aliviando os momentos de tensão e cansaço. Obrigada por me proporcionarem a oportunidade de compartilhar desse sentimento de intensidade inexplicável. Vocês são como partes de mim fora do meu corpo!

À minha família, tios, primos e cunhados, sempre torcendo e acreditando em mim. Em especial às minhas tias Marluce Melo e Maria Auxiliadora Carvalho por serem tão confiantes no meu potencial e por se realizarem com as minhas conquistas! À Marluce Lopes (Babá) pelo cuidado, sempre tentando amenizar os momentos árdus, se preocupando até com a minha alimentação, me ajudando a aliviar a tensão degustando seus bolos, doces e agrados. Amo vocês!

Ao meu orientador o Prof. Dr. Waltécio de Oliveira Almeida pelos ensinamentos, confiança e incentivo à pesquisa. Obrigada pela oportunidade e por acreditar em mim!

Ao Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa pela disponibilidade e contribuições positivas para o melhoramento desse trabalho. Ao demais integrantes do Laboratório de Pesquisa e Produtos naturais (LPPN), especialmente à Profa. Msc. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues e aos alunos Fábio Galvão, George Souza, Walmir Emanuel e Manuele Eufrasio pela ajuda, dedicação e empenho. Muito obrigada!

Aos professores do Laboratório de Farmacologia e Química Molecular (LFQM) Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes e Dra. Marta Regina Kerntopf pela disponibilização do laboratório para a realização dos testes farmacológicos e pelas contribuições ao trabalho. À Andreza Guedes pela disponibilidade e colaboração na realização dos testes.

Ao Prof. Dr. Henrique Douglas Melo Coutinho pela disponibilização do laboratório para os testes microbiológicos. Aos demais integrantes do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), em especial à Profa. Msc. Flaviana Moraes, Jacqueline Andrade, Gláucia Guedes, Saulo Tintino e Liscassia Beatriz pela amizade, auxílio, dedicação e paciência na realização dos testes. Obrigada!

À amiga Débora Lima Sales, pela irmandade, incentivo, companheirismo, dedicação, atenção. Obrigada pela sua ajuda incondicional no trabalho e na vida! Pela convivência fraterna, compartilhar comigo dos sorrisos, lágrimas, dissecações, testes, dias de preguiça e madrugadas de estudo. Você é, de fato, uma amiga pra todas as horas! À Monalissa Novais pelos anos de cumplicidade, lealdade e amizade sincera. Exemplo de que o tempo não destrói um sentimento quando ele é verdadeiro. Mesmo nem sempre estando diariamente presente, sei que você está comigo sempre que eu precisar. Obrigada por me escutarem nas horas de desespero e pela força e incentivo para seguir em frente confiante, mesmo quando tudo parecia desmoronar. Na minha definição de amizade, o nome de vocês deve sempre estar incluído! Vocês são minha família por opção!

Aos colegas do Laboratório de Zoologia João Antônio Filho, José Guilherme, Diego Teles, Samuel Ribeiro, Samuel Brito e Felipe Ferreira pela ajuda nas coletas, conversas, acolhimento e convivência agradável. Em especial a Samuel Ribeiro pela amizade e atenção, obrigada por tudo que você fez por mim! Aos colegas de mestrado e laboratório Mário Cabral e Diógenes Dias pela convivência amigável e companheirismo na realização dos testes farmacológicos.

Aos meus colegas de turma, Jacqueline Andrade, Renata Sampaio, Naiana Seixas, Natallyanea Bezerra, Luíz Jardelino, Diógenes Dias, Thiago Almeida, Gillena Sampaio, Anita Oliveira, Patrícia Figueiredo, Leonardo Landim e Renata Lima. Às amigas com quem o mestrado me proporcionou construir ou reforçar os laços de amizade, Heloisa Helena, Samara Brito e Helenicy Veras. Obrigada pelos momentos de descontração tão importantes para renovar as forças que me moveram a seguir adiante.

Às novas amigas, Kadidja Luciana, Jéssika Dias e Aline Lima, que “a vida tão generosa comigo, veio de amigo a amigo, me apresentar”. Obrigada pelas conversas e momentos agradáveis.

Ao Prof. Dr. Robson Waldemar Ávila pela atenção e disponibilização de material de pesquisa e fotos para enriquecer esse trabalho. Aos seus orientandos pela ajuda na fixação dos espécimes.

Ao Prof. Dr. Rômulo Romeu da Nóbrega Alves pela disponibilidade, ensinamentos e contribuições para enriquecimento desse trabalho.

Aos professores do Programa de Bioprospecção Molecular pelos ensinamentos transmitidos. Às Coordenadoras Dra. Marta Maria de Almeida Souza e Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva, às secretárias Maria Lenira Pereira e Maria Andecieli Rolim de Brito pela disposição em ajudar.

À Universidade Regional do Cariri – URCA pela oportunidade.

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), pela concessão da autorização de coleta. À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), pelas linhagens microbianas utilizadas nos ensaio *in vitro*. À Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ), pela doação dos camundongos utilizados nos testes *in vivo*.

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

RESUMO

Avaliação da composição química e atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo extraído da gordura corporal de *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Ophidia) da Chapada do Araripe no Nordeste brasileiro

Spilotes pullatus, popularmente chamada de caninana, é cobra pertencente à família Colubridae, com hábitos diurnos, dentição áglifa, sendo associado em estudos etnozoológicos para fins medicinais e mágico-religioso. Esse trabalho objetivou a análise química do óleo extraído da gordura corporal de *Spilotes pullatus*, bem como avaliar sua atividade antimicrobiana, quando isolado e em associação com aminoglicosídeos, frente a cepas de fungos e bactérias padrões e multirresistentes, assim como verificar seu potencial anti-inflamatório em modelos de inflamação tópica aguda e crônica. Os animais foram coletados na encosta da Chapada do Araripe no município do Crato, sul do estado do Ceará, região do Cariri. O óleo da gordura corporal foi extraído em aparelho Soxhlet tendo hexano como solvente. Os ésteres metílicos presentes na amostra foram identificados por meio de cromatografia gasosa / espectrometria de massas, apresentando porcentagem de ácidos graxos saturados e insaturados de 33,59% e 61,38%, respectivamente, com componentes majoritários os ácido elaídico (37,26%) e linoléico (17,28%). A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em caldo frente linhagens das bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* e entre os fungos *Candida tropicalis*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. O óleo isoladamente não inibiu o crescimento de nenhum dos microrganismos, embora tenha demonstrado sinergismo com a Gentamicina frente a todas as cepas de bactérias e antagonismo a Amicacina e Neomicina em cepas de *E. coli*. O aspecto anti inflamatório foi avaliado a partir do modelo de edema de orelha tópico induzido pela aplicação única e múltipla de óleo de cróton. O óleo demonstrou um caráter anti-inflamatório para os dois modelos analisados. No modelo de aplicação única de óleo de cróton os grupos do óleo de *S. pullatus* e da dexametasona tiveram a redução da inflamação de 45,20% e 62,11%, respectivamente, ambos com $p < 0,001$. Para o modelo de aplicação múltipla, o óleo de *S. pullatus* reduziu 67,92% ($p < 0,01$) e a dexametasona 45,68% ($p < 0,001$). Mais estudos ainda são necessários visando definir seu mecanismo de ação.

Palavras-chave: Caninana; Etnozoologia; Ácidos graxos; Atividade antimicrobiana; Atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Evaluation of the chemical composition and antimicrobial and anti-inflammatory oil extracted from body fat *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) (Colubridae: Ophidia) of the Araripe in Northeast Brazil

Spilotes pullatus, popularly called caninana, is snake belonging to the family Colubridae, with daytime habits, teething aglyph, being associated in studies ethnozoologics for medicinal and magical-religious. This study aimed to analyze the chemical oil extracted from body fat *Spilotes pullatus* and evaluate its antimicrobial activity when alone and in combination with aminoglycosides against strains of fungi and bacteria and multiresistant patterns, as well as verify their potential anti-inflammatory in models of acute and chronic inflammation topical. The animals were collected in the slope of the Chapada Araripe, the municipality of Crato, in the southern state of Ceara, region of Cariri. The oil from the fat body was extracted in Soxhlet apparatus and hexane as solvent. The methyl esters in the sample were identified by gas chromatography / mass spectrometry, showing the percentage of saturated and unsaturated fatty acids 33.59% and 61.38%, respectively, with the major components acids elaidic (37.26%) and linoleic (17.28%). The antimicrobial activity was performed by broth microdilution against strains of the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* between fungi and *Candida tropicalis*, *Candida albicans* and *Candida krusei*. The oil alone did not inhibit growth of any microorganisms, although demonstrated synergism with Gentamicin against all strains of bacteria and antagonism in Neomycin and Amikacin strains of *E. coli*. The anti-inflammatory aspect was evaluated from the model of ear edema induced by topical application of single and multiple croton oil. The oil has demonstrated anti-inflammatory in character for both models analyzed. In the model of single application of croton oil groups oil *S. pullatus* and dexamethasone had a reduction of inflammation of 45.20% and 62.11%, respectively, both $p < 0.001$. For multiple-application model, the oil *S. pullatus* 67.92% reduced ($p < 0.01$) and 45.68% dexamethasone ($p < 0.001$). More studies are still needed in order to define its mechanism of action.

Keywords: Caninana; Ethnozoology; fatty acids; antimicrobial activity; anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Animais usados para fins medicinais no Brasil, com os grupos e a quantidade de espécies de cada. Adaptado de Alves et al. (2013b).....24
- Figura 2** – Espécime jovem de *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758). Fonte: Ávila, R.W.....27
- Figura 3** – Estruturas químicas dos ácidos graxos majoritários presentes no óleo fixo de *Spilotes pullatus*.....37
- Figura 4** – Placa de microdiluição com resultados da concentração inibitória mínima, uma hora após a aplicação de resazurina. Na qual PA: *Pseudomonas aeruginosa*; EC: *Escherichia coli*; SA: *Staphylococcus aureus*; KP: *Klebsiella pneumoniae*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*. Foto da autora.....44
- Figura 5** – Placas de microdiluição com resultados da modulação de antibióticos, uma hora após aplicado resazurina. Da esquerda para a direita *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na qual A – Amicacina; G – Gentamicina; N – Neomicina. Fotos da autora.....46
- Figura 6 - Efeito tópico do óleo fixo de *Spilotes pullatus* (OFSP) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss.** Os animais foram pré-tratados com salina, 0,9% (Controle), dexametasona (DEX), OFSP e após 15 minutos, receberam topicamente solução de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do edema calculado a partir das massas de discos de 6mm de diâmetro obtidos das orelhas após 6 horas de aplicação do óleo de cróton. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (***) $p < 0,001$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls).....52
- Figura 7 - Curva tempo-resposta do efeito do OFSP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss.** Os animais receberam OC em acetona na orelha direita em dias alternados e veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha tratada com o agente flogístico foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação de OC), a orelha direita de cada animal recebeu veículo salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou OFSP bruto (20µL, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 4 dias posteriores. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente

diferentes para $P < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).....53

Figura 8 - Efeito tópico do óleo fixo de OFSP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss. A aplicação de OC foi conduzida em dias alternados, durante 9 dias. No 5º, 6º, 7º, 8º e 9º dias do experimento, a orelha direita de cada animal recebeu salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou OFSP bruto (20µL, 2 vezes ao dia). O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do percentual de edema calculado a partir das massas de discos de 6 mm de diâmetro obtidos das orelhas após 192 horas da primeira aplicação do OC. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo (C) e foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguida do teste de Student-Newman-Keuls).....54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados do óleo de *Spilotes pullatus*. por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas37
- Tabela 2** – Origem das linhagens e perfil de resistência das bactérias a antibióticos42
- Tabela 3** – Resultado do OFSP utilizado como modulador da ação dos antifúngicos microdiluídos, e o Controle, onde não foi utilizado o OFSP, todos os resultados em µg/mL. Onde CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*.....45
- Tabela 4** – Valores da CIM (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do óleo de *S. pullatus* frente a *Staphylococcus aureus* 358 (SA 358) *Escherichia coli* 27 (EC 27) e *Pseudomonas aeruginosa* 03 (PA 03).....45
- Tabela 5** – Cronograma de execução do teste de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.....50
- Tabela 6** – Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona e OFSP.....52
- Tabela 7** – Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona e OFSP.....54

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A – Amicacina

ANOVA – Análise de Variância

ATCC – *American Type Culture Collection*

BHI – *Brain Heart Infusion*

CA – *Candida albicans*

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM/8 – Concentração subinibitória

CITES – Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem

CK – *Candida krusei*

CT – *Candida tropicalis*

DEX – Dexametasona

DMSO – Dimetilsulfóxido

E.I.M – Efeito Inibitório Médio da inflamação

E.P.M. – Erro Padrão da Média

EC – *Escherichia coli*

G – Gentamicina

HIA – *Heart Infusion Agar*

i.d. – Indicativo de densidade

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

ICMBio – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza

KP – *Klebsiella pneumoniae*

Mod – Massa do disco retirado da orelha direita

Moe – Massa do disco retirado da orelha esquerda

N – Neomicina

OC – Óleo de cróton

OFSP – Óleo fixo de *Spilotes pullatus*

p – Nível de significância

PA – *Pseudomonas aeruginosa*

PE – Percentual de edema

pH – Potencial hidrogeniônico

SA – *Staphylococcus aureus*

SISBIO – Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

TR – Tempo de Retenção

URCA – Universidade Regional do Cariri

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS.....	21
Objetivo Geral.....	21
Objetivos Específicos	21
REFERENCIAL TEÓRICO.....	23
Etnozoologia e Zooterapia	23
Répteis	25
<i>Spilotes pullatus</i> (Linnaeus, 1758)	27
Resistência Microbiana.....	28
Descoberta de Novos Fármacos e Conservação	29
METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
PARTE I - Aspectos Éticos da Pesquisa, Coleta Animal, Extração e Análise Química do Óleo Fixo de <i>Spilotes pullatus</i>	33
Introdução	33
Material e Métodos.....	33
<i>Licença de coleta</i>	33
<i>Aspectos Éticos da Pesquisa</i>	33
<i>Material zoológico</i>	34
<i>Extração do óleo fixo de Spilotes pullatus</i>	34
<i>Determinação dos ácidos graxos</i>	34
<i>Análise do óleo fixo de Spilotes pullatus por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)</i>	35
Resultados e Discussão.....	35
PARTE II - Ensaio Microbiológicos.....	39
Introdução	39
Material e Métodos.....	41
<i>Material Bacteriano</i>	41
<i>Material Fúngico</i>	41
<i>Drogas</i>	42
<i>Teste de atividades bactericida e fungicida</i>	42

<i>Teste de suscetibilidade às drogas</i>	42
Resultados e Discussão.....	43
PARTE III - Ensaio Farmacológicos	46
Introdução	46
Material e Métodos.....	46
<i>Animais</i>	46
<i>Edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton</i>	47
<i>Edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton</i>	47
<i>Quantificação do edema</i>	48
Resultados e Discussão.....	49
CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS.....	66

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A espécie humana apresenta uma empatia intrínseca ao que vem da natureza. Essa afeição é explicada pela hipótese da biofilia e justifica a histórica relação desenvolvida entre os homens e outros seres vivos (Santos-Fita e Costa Neto, 2007). Ainda segundo o autor, o conhecimento humano adquirido a respeito das espécies animais reflete-se nas crenças e práticas culturais relacionadas com a fauna de cada local.

Além do aspecto cultural e religioso, os recursos biológicos desempenham importante papel no tocante a medicina popular (Alves et al., 2009d). Os animais, juntamente com plantas, constituem importante alternativa terapêutica, são a base de sistemas tradicionais de saúde e por muitas vezes configuram o único recurso disponível para as populações locais (Alves et al., 2008b).

A escassez de atendimento médico atrelado às condições socioeconômicas impossibilitam a aquisição dos medicamentos industrializados, devido aos altos preços, por parte da população brasileira (Alves et al., 2008b). Estudos etnofarmacológicos são importantes a fim de esclarecer a eventual utilidade terapêutica dos recursos faunísticos (Pieroni et al., 2002) e, assim, impulsionar a descoberta de novos fármacos.

Atrelada ao estudo farmacológico, a microbiologia vem depositando nos recursos naturais uma tentativa de controle da preocupante resistência dos microrganismos às drogas (Sousa et al., 2010). Espera-se que produtos extraídos da natureza possuam maior eficácia no controle microbiológico ou, ainda, na potencialização do efeito produzido pelos fármacos já existentes (Gibbons, 2004).

As múltiplas utilizações da fauna pela espécie humana já mostram resultados negativos. As populações de répteis estão em declínio acentuado (Alves e Pereira Filho, 2007; Alves et al., 2013a) que pode estar relacionado a um misto de fatores, como degradação e destruição de hábitat e uso de forma não sustentável por populações tradicionais (Alves et al., 2008b). Essa realidade é mais agravante no caso das cobras por sofrerem com antipatia da população sendo sempre levadas à morte por serem associadas a animais peçonhentos e que colocam em perigo à saúde humana (Alves et al., 2009a, b; Santos-Fita et al., 2010).

Alguns estudos farmacológicos já foram desenvolvidos com produtos derivados da herpetofauna. As gorduras das espécies *Tupinambis meriana*, *Boa constrictor*, *Rhinella jimi*, *Leptodactylus macrosternum* e *L. vastus* já foram alvo de pesquisas visando avaliar atividades antimicrobiana e anti-inflamatória (Falodun et al., 2008; Ferreira et al., 2009; 2011; Cabral, 2012; Sales, 2012).

Spilotes pullatus, popularmente chamada de caninana, é uma cobra pertencente à família Colubridae, de hábitos diurnos e semi-arborícola, alimenta-se de pequenos vertebrados, sendo amplamente distribuída por todo o país (Mendonça et al., 2011). Citado em pesquisas etnozoológicas e zooterápicas, alguns estudos relatam seu uso medicinal, mas a comprovação de uma possível eficácia ainda não foi pesquisada (Alves e Rosa, 2007; Alves et al., 2007a; Alves et al., 2013a, b).

Tendo em vista o acentuado uso de fauna na medicina popular, especialmente de répteis, além do aspecto conservacionista em relação à exploração excessiva dos recursos naturais, há a necessidade de isolar e comprovar as propriedades farmacológicas dos zooterápicos devido ao perigo de transmissões de doenças (Alves e Rosa, 2005; Hunt e Vincent, 2006) como também pela necessidade de otimização desses produtos para justificar o seu uso na medicina tradicional (Alves, 2009).

Este trabalho visa realizar a análise química, avaliar a atividade microbiológica e anti-inflamatória do óleo extraído da gordura corporal de cobras *Spilotes pullatus*.

Tendo em vista as múltiplas atividades biológicas realizadas, esse trabalho será dividido, logo após objetivos e referencial teórico, em três partes distintas de metodologia, resultados e discussão, cada uma contendo introdução, material e métodos, resultados e discussão. O primeiro refere-se aos aspectos éticos e legais e extração e análise química do óleo. O segundo abordará os dados dos testes microbiológicos e o terceiro os experimentos farmacológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a composição química, as atividades microbiológica e farmacológica do óleo fixo extraído da gordura corporal de *Spilotes pullatus* (OFSP).

Objetivos Específicos

1. Realizar a obtenção do óleo fixo extraído da gordura corporal de *Spilotes pullatus* e a análise química dos seus constituintes;
2. Avaliar a Concentração Inibitória Mínima do óleo fixo de *Spilotes pullatus* (OFSP) frente a linhagens padrões de bactérias e fungos;
3. Verificar o efeito combinado do OFSP com aminoglicosídeos em cepas de bactérias multirresistentes;
4. Analisar a ação anti-inflamatória do OFSP em aplicação tópica.

REFERENCIAL TEÓRICO

REFERENCIAL TEÓRICO

Etnozoologia e Zooterapia

Os recursos biológicos disponíveis na natureza são experimentados por comunidades humanas das mais diversas formas, como fonte de energia na alimentação, materiais para construção civil, no vestuário, uso medicinal e mágico religioso (Alves et al., 2007a; Ribeiro et al., 2010). A conexão de culturas humanas com a fauna especificamente é bastante diversificada e data desde tempos remotos (Alves, 2007; Alves e Souto, 2010).

Essas interações (passadas e atuais) entre homens e animais são abordadas pela perspectiva da Etnozoologia (Alves e Souto, 2010). Embora o termo só tenha aparecido na literatura em 1914 por Henderson e Harrigton, a primeira definição de Etnozoologia foi dada por Manson (1899) como a zoologia tal como narrada pelo selvagem. Com o avanço das pesquisas, outros elementos foram incorporados ao estudo etnozoológico. Em uma perspectiva mais atual, Alves e Souto (2010) afirmam que a Etnozoologia busca compreender como os mais variados povos percebem e interagem com os recursos faunísticos ao longo da história humana.

Diante das variadas utilizações dos animais, o uso especificamente para fins medicinais é conhecida como Zooterapia (Alves e Rosa, 2005; Marques, 1994). Esta deve ser compreendida como o uso de remédios elaborados a partir de partes do corpo dos animais, de produtos de seu metabolismo (como secreções corporais e excrementos) ou de materiais construídos por eles, como ninhos e casulos (Costa Neto e Alves, 2010). Supostamente esta é uma prática presente em todas as culturas humanas, como afirma Marques (1994) em sua “hipótese da universalidade zoterápica”.

Esses conhecimentos e práticas zoterapêuticas são passados através de gerações por meio da oralidade, estando ligados e variando de acordo com a cultura de cada região e o modo como as pessoas veem os animais (Fleming-Moran, 1993; Alves e Rosa, 2006; Santos-Fita e Costa Neto, 2007; Sassi et al., 2007).

Segundo Alves et al., 2013b, os recursos faunísticos utilizados na medicina popular no Brasil compreendem um total de 354 espécies, distribuídos em doze grupos taxonômicos

distintos, distribuídos em cnidários, anelídeos, moluscos, equinodermos, aracnídeos, insetos, crustáceos, peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Figura 1). Os répteis são apontados como o terceiro grupo com maior número de espécies, com 57 citadas.

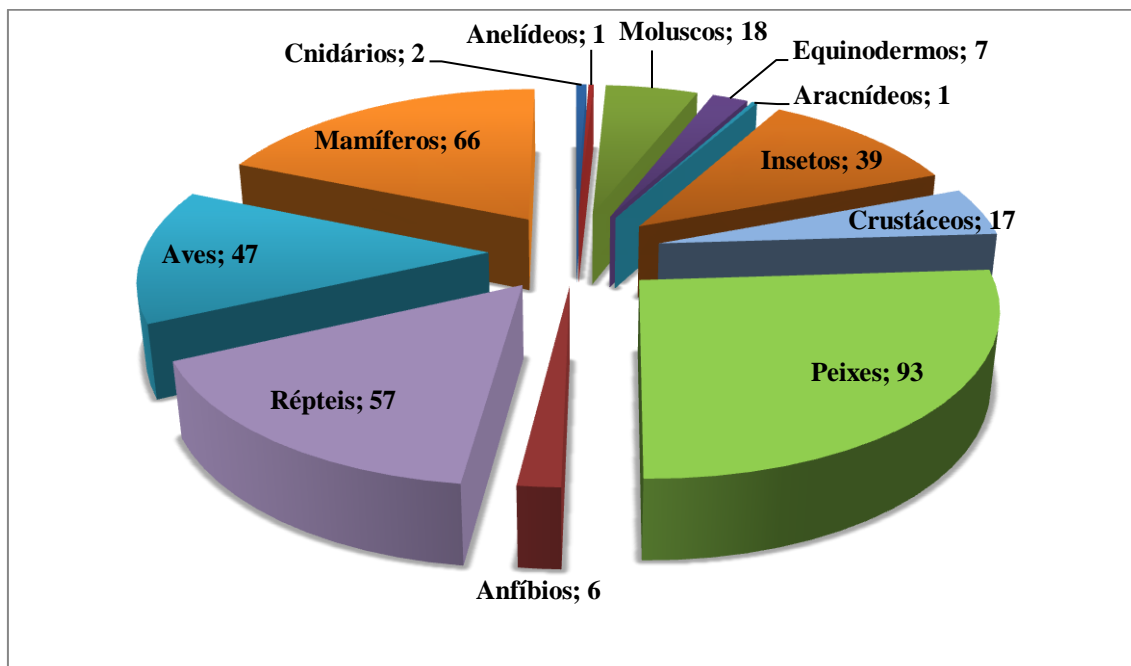


Figura 1 – Animais usados para fins medicinais no Brasil, com os grupos e a quantidade de espécies de cada. Adaptado de Alves et al. (2013b).

Tais produtos zoterápicos são prescritos popularmente para os mais variados fins, abrangendo todos os sistemas humanos e condições espirituais. Como mais citados destacam-se os sistemas respiratório (asma e bronquite) e gastrointestinal (Costa Neto, 1999; Alves e Pereira-Filho, 2007; Alves e Rosa, 2007; Alves et al., 2008a, 2009c; Ferreira et al., 2011).

Assim como as patologias, as partes utilizadas e modo de preparo são bastante diversificados, variando de acordo com o animal e a condição a ser tratada (Alves et al., 2009d; Alves et al., 2013a). Vários estudos apontam a utilização do mesmo animal para o tratamento de variadas condições (Alves et al., 2013b).

O preparo dos produtos pode ser feito a partir de animais inteiros ou partes como pena, perna, pêlo, couro, dente, banha (gordura), leite, carne, esporão, chifre, espinho, escama,

unha, sangue, pênis, ossos, fígado, coração, cabeça, testículo, tutano, olho, orelha, entre outros (Costa Neto e Alves, 2010). Dentre essas partes, a banha destacou-se como a mais citada (Costa Neto, 1999; Lima, 2000; Silva et al., 2004), podendo ser colocado diretamente no local alvo ou ingerido oralmente (Alves e Rosa, 2006; Alves et al., 2008b; 2013b). Geralmente partes duras são secas e transformadas em pó que pode ser misturado à comida ou feito chá (Alves, 2007; Alves et al., 2008b; 2013b). Outra forma é a mistura de vários produtos, inclusive plantas, chamadas de garrafadas (Alves, 2007; Alves et al., 2008c).

No Brasil, assim como em outras partes do mundo, os produtos naturais são comercializados abertamente em mercados públicos (Alves et al., 2009c, d; 2013b). Belém, Fortaleza, Salvador e Recife foram apontadas em estudo de Alves et al. (2008c) como centros fornecedores de produtos. Ferreira et al. (2012) acrescentou Maceió e Aracaju.

A atividade comercial de produtos zoológicos, embora não represente a maior ameaça à diversidade de espécies, é um fator importante a ser enfatizado. O desenvolvimento de políticas de conservação e uso sustentável da fauna é de fundamental importância, especialmente observando a proporção de animais ameaçados de extinção entre os utilizados por populações humanas (Alves et al., 2013a).

Répteis

Anfíbios e répteis tem se relacionado com as comunidades humanas durante milênios (Alves et al., 2013a). As diferentes formas que as culturas humanas se relacionam com esses animais constitui o objeto de estudo da Etnoherpetologia, uma subdivisão da Etnozoologia (Alves, 2006; Alves e Pereira Filho, 2007; Alves et al., 2007a, 2009b; Alves e Santana, 2008; Santos-Fita et al., 2010).

Dentre a fauna herpetológica, Alves et al. (2013a) enumeram um total de 284 espécies de répteis utilizadas para fins medicinais no mundo todo. Nesse total, as cobras destacaram-se como o grupo mais numeroso com 123 espécies relacionadas (Alves et al., 2013a). É atribuído aos répteis o tratamento de 194 condições e patologias, sendo as mais citadas: asma, reumatismo, feridas, trombose e bronquite (Alves et al., 2013b).

Além de listar a quantidade de espécies utilizadas, pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de relacionar as partes dos animais e as condições a serem tratadas. Silva et al. (2004) associam o uso de diferentes partes como banha, couro e guizo de cobra cascavél (*Crotalus durissus*), jacaré (*Alligatoridae*) e tartaruga (*Chelonia*) para o tratamento de dores nas pernas, cansaço, osteoporose, reumatismo, artrite e luxação. Alves et al. (2007b) ainda citam o “chocalho” (da cauda) da cascavél para a asma. Silva (2008) destaca o uso da banha de sucuri (*Eunectes murinus*) e de jacarés em uma diversidade de condições, como problemas ósseos, musculares, respiratórios, inflamatórios e circulatórios.

Arelado ao uso como alimento e na medicina tradicional, os répteis têm sido explorados de diversas formas, como a comercialização, animais de estimação e em rituais mágico-religiosos (Alves e Pereira Filho, 2007; Alves et al., 2009b; 2010). Imagens (representações culturais), mitos e crenças sobre esta classe estão presentes em muitas sociedades e desempenham um importante papel em rituais afro-brasileiros (Santos-Fita et al., 2010). Sua utilização varia entre o tratamento de problemas físicos e espirituais, oferta às divindades, ou como agradecimento pelas bênçãos alcançadas (Alves e Pereira Filho, 2007).

Tais utilizações tem gerado impactos em populações de répteis notoriamente refletidos na redução de sua abundância constatada nos últimos anos (Alves e Pereira Filho, 2007; Alves et al., 2013a). A atenção a este tocante é ainda mais importante quando levada em consideração que entre as espécies utilizadas mundialmente na medicina popular, 182 estão listadas nas IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) e 93 relacionadas em algum dos apêndices de CITES (Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem) (Alves et al., 2013a).

Outra ameaça a biodiversidade é a comercialização dos animais selvagens. Embora a legislação brasileira proíba, a venda e o uso de produtos e subprodutos de cobras (e outros animais) é generalizada em todo o país, estando em expansão para áreas urbanas em mercados e feiras abertas nas grandes cidades (Alves et al., 2008c, 2009c, d; Ferreira et al., 2012). Apesar de ser prática frequente, ainda não é possível avaliar a gravidade do impacto causado às populações de répteis consequente dessa interferência humana (Alves e Pereira Filho, 2007). Os produtos à base de animais não ficam expostos como as plantas, fator que mostra que os comerciantes estão conscientes da ilegalidade dessa atividade e a possibilidade de fiscalização por autoridades ambientais (Alves e Pereira Filho, 2007; Alves e Rosa, 2007).

***Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758)**

Spilotes pullatus (Linnaeus, 1758) (Figura 2) é uma cobra ovípara, de grande porte, chegando a medir 3m de comprimento, tem atividade diurna e hábitos terrestres e arbóreos (Bernarde e Abe, 2006; França et al., 2008; Marques et al., 2001). Sua dieta consiste basicamente de pequenos mamíferos, anuros, aves e seus ovos (Marques et al., 2001; Bernarde e Abe, 2006; França e Araújo, 2007; França et al., 2008). Embora muito temida pelas populações rurais pela sua agressividade, possui dentição áglifa e, portanto, não inocula veneno (Marques e Sazima, 2004).



Figura 2 – Espécime jovem de *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758). Foto: Ávila, R.W.

Considerada uma espécie generalista, possui ampla distribuição em toda a América do Sul (Marques et al., 2001), podendo ser encontrada inclusive em áreas urbanas e aparentemente adapta-se bem a meios alterados pela ação humana (Costa et al., 2010).

Vários estudos etnozoológicos associam a utilização de *S. pullatus* para fins medicinais, mágico-religioso, bem como com relações conflituosas com a espécie humana e caracterizam-se por um choque de interesses humanos com as necessidades ou comportamento dos animais (Alves et al., 2010; 2012). Essa incompatibilidade é um fator precursor à predação de espécimes, merecendo atenção na tentativa de medidas de preservação que beneficiem ambas as partes (Alves et al., 2010). Nas indicações zoterapêuticas, faz-se uso de todo o corpo do animal no combate a dor causada pela picada de insetos e cobras (Alves e Pereira Filho, 2007; Alves e Rosa, 2007; Alves et al., 2009a; 2009d).

Segundo o método de pesquisas etnobiológicas quimiotaxonômico ou filogenético, taxóns próximos podem compartilhar mesmas propriedades farmacológicas. *Oxyrhopus trigeminus* é citada em estudos zoterapêuticos para o tratamento de reumatismo (Alves et al., 2009d) e em 2011 estava incluída na família Colubridae (Bérnils e Costa, 2011), atualmente compartilhando com a *S. pullatus* a super família Caenophidia (Bérnils e Costa, 2012), segundo a Sociedade Brasileira de Herpetologia.

Resistência Microbiana

O uso indiscriminado e abusivo de medicamentos alopáticos no controle de microrganismos nos últimos anos vem resultando em uma questão de saúde pública, tendo em vista a evolução da resistência de fungos e bactérias às drogas e consequentemente a perda da eficácia dos antimicrobianos (Dias e Monteiro, 2010).

A resistência microbiana é um problema tanto para a população, como para as instituições de saúde, pois o aumento da morbidade e mortalidade implica em ônus financeiros (Coutinho et al., 2005). O abuso do uso de medicamentos antimicrobianos está presente, inclusive, em países desenvolvidos. Duarte (2006) alertou para o consumo de mais de uma tonelada de antibióticos por dia na Europa.

Na tentativa de um controle mais eficaz de microrganismos, algumas atitudes estão sendo tomadas, como a redução do uso de antibióticos. Atrelada a isso, pesquisadores tem testado produtos naturais isolados e em associação com os medicamentos originais (Salvat et

al., 2001; Shin e Pyun, 2004; Sousa et al., 2010), almejando uma potencialização da ação dos mesmos e minimização dos efeitos indesejáveis (Gibbons, 2004; Gurib-Fakim, 2006).

O interesse científico pela química e estudos farmacológicos e microbiológicos de produtos naturais tem se acentuado nos últimos anos, com pesquisas voltadas à descoberta de novas drogas devido a crescente resistência apresentada aos fármacos (Coutinho et al., 2008). Baquero e Blázquez (1997) já alertavam para o risco do retorno a uma era pré-antibiótico. Em contraponto ao reduzido número de novos antibacterianos, os antimicóticos têm aumentado, embora ainda encontrem-se em desvantagem em relação à eficácia e quantidade dos antibióticos. Infecções fúngicas oportunistas têm aumentado e a dificuldade no tratamento pode estar associada à resistência desenvolvida às drogas (Araújo et al., 2004).

Esse conhecimento do potencial antimicrobiano de produtos naturais faz-se necessário para um melhor entendimento das suas propriedades, comprovação de sua eficácia e desenvolvimento de drogas mais complexas, de difícil adaptação (Daferera et al., 2003).

Descoberta de Novos Fármacos e Conservação

Animais são utilizados por populações humanas de variadas formas (Alves et al., 2007a; Ribeiro et al., 2010). Répteis, especialmente as cobras, representam uma importante parte desse uso (Alves et al., 2013a). Na maioria das vezes a exploração é excessiva e sem preocupação com a conservação, estando algumas espécies já sofrendo com esse impacto (Alves e Pereira Filho, 2007).

O declínio e extinção das espécies observado e acentuado nos últimos anos é preocupante, estando associado a um misto de fatores que resultam quase sempre de impactos antrópicos ao meio ambiente sem a preocupação com a conservação. Destruição, fragmentação, degradação de habitat (incluindo poluição), superexploração das espécies para uso humano, introdução de espécies exóticas e aumento da ocorrência de doenças são as maiores ameaças à diversidade biológica causadas pelas ações dos homens (Gibbons et al., 2000).

A utilização de produtos de origem animal e vegetal por comunidades tradicionais vem sendo alvo de estudos etnofarmacológicos na tentativa de esclarecer e comprovar suas

possíveis utilidades terapêuticas, estimulando a atenção de indústrias farmacêuticas voltadas para a descoberta de novos fármacos (Alves e Rosa, 2005). Existem 225 drogas que estão sendo desenvolvidas a partir de produtos naturais abrangendo o combate a diversas patologias, como câncer, agentes infecciosos, doenças neurais, cardiovasculares, gastrointestinais, dermatites, doenças metabólicas e hormonais. (Harvey, 2008).

Os répteis vêm ganhando cada vez mais espaço nos trabalhos realizados para a descoberta de novas drogas, já tendo espécies com alguma utilização na medicina moderna (Alves et al., 2013a). Dentre as cobras, Bisset (1991) destaca que o veneno de alguns representantes das famílias Viperidae, Crotalidae e Elapidae apresenta atividade analgésica mais forte que a morfina, podendo ser usado em pacientes terminais com câncer.

O processo de prospecção dos recursos naturais para a produção de novos fármacos pode levar à exploração da biodiversidade com impactos negativos (Hunt e Vincent, 2006). A utilização de espécies sem uma base sustentável cria preocupações para a conservação e manejo. É atribuído ao Brasil a presença de 15 a 20% da diversidade biológica do mundo e o maior número de espécies endêmicas (Alves et al., 2013b). O potencial médico da fauna brasileira e as possibilidades de exploração excessiva, ou mesmo a extinção de espécies, requer com urgência uma avaliação ecológica, não apenas pela sua dimensão zoológica, mas também cultural, para melhor compreensão do uso e estratégias de preservação dos animais (Alves et al., 2008c). O cuidado com os impactos negativos causados à biodiversidade além de voltar-se à utilização tradicional dos animais ou seus produtos, deve compreender também a utilização pela indústria farmacêutica (Marques, 1997).

Considerando-se que a maioria das espécies medicinais usada compreende animais silvestres, sendo geralmente necessária a morte dos mesmos para obtenção dos produtos zoterápicos (Alves et al., 2009c), a inclusão da zooterapia na multidimensionalidade do desenvolvimento sustentável é interpretada como um componente fundamental para garantir a sustentabilidade de uso dos recursos faunísticos (Costa Neto, 1999; Alves et al., 2008b).

Embora as cobras sejam consideradas seres sagrados em algumas culturas, na maioria das vezes são vistas como criaturas abomináveis e associadas à imagem de animais peçonhentos que são capazes de causar grandes danos, muitas vezes levando à morte (Alves et al., 2010). Consequentemente, essa visão provoca matanças desnecessárias e colocando cadeias alimentares sensíveis em risco (Alves et al., 2009a; b; Santos-Fita et al., 2010).

Visto o impacto negativo que a interação humana exerce na biodiversidade e a ainda difícil avaliação da sua magnitude para a sobrevivência das espécies envolvidas (Souto et al., 2001; Almeida e Albuquerque, 2002; Alves e Rosa, 2005; Alves e Pereira Filho, 2007; Alves et al., 2008c), estudos etnozoológicos podem auxiliar nesse contexto, bem como no desenvolvimento de planos de manejo sustentável para conservação da diversidade biológica (Alves e Souto, 2011; Alves et al., 2013a).

METODOLOGIA, RESULTADOS E DISCUSSÃO

PARTE I - Aspectos Éticos da Pesquisa, Coleta Animal, Extração e Análise Química do Óleo Fixo de *Spilotes pullatus*

Introdução

Os triglicerídeos são compostos formados pela união de três ácidos graxos a um glicerol. Óleos e gorduras, por sua vez, são misturas de triglicerídeos de diferentes composições em ácidos graxos. Os ácidos graxos são uma cadeia de carbonos com um grupo carboxílico (COOH) em um extremo e no outro um grupo metila (CH₃). De acordo com a presença, ou não, de ligações duplas entre os carbonos, os ácidos graxos são divididos em saturados (sem a presença de ligação dupla) e insaturados (com ligações duplas) (Vianni e Braz-Filho, 1995; Brandão et al., 2005). Ácidos graxos insaturados podem ser capazes de inibir a atividade microbiana (Nobre et al., 2002; Agoramorthy et al., 2007) e o conhecimento desse tipo de ácido graxo pode ser indicativo de eficácia no controle microbiano.

Material e Métodos

Licença de coleta

A captura de espécimes de *Spilotes pullatus* teve a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob número 29838-1, emitida em 19/08/2011 (Anexo I).

Aspectos Éticos da Pesquisa

Este estudo encontra-se em conformidade com as normas de Bioética para procedimentos envolvendo animais para fins científicos, reconhecidas pela lei 11.794/08. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Regional do Cariri (URCA), com parecer N° 16/2012 (Anexo II).

Material zoológico

A coleta dos quatro espécimes utilizados foi realizada na encosta da Chapada do Araripe, no município do Crato, região do Cariri, sul do Ceará, onde o clima semiárido domina grande parte da região, com temperatura variando entre 16 e 29°C.

Na coleta dos répteis foram utilizadas armadilhas de queda (“pit-fall traps”) seguindo modelo padrão descrito por Auricchio e Salomão (2002). De forma complementar, realizaram-se coletas ativas vasculhando microambientes propícios à ocorrência desses animais (troncos caídos, folhiço, buracos no solo).

Os espécimes coletados vivos foram sacrificados por congelamento para posterior retirada da gordura localizada na região ventral do animal. Um espécime testemunho foi fixado em formol 10%, conservado em álcool 70% e depositado na coleção de vertebrados do Laboratório de Zoologia da Universidade Regional do Cariri- URCA (LZ-URCA), sob número de tombo URCA-2096.

*Extração do óleo fixo de *Spilotes pullatus**

A extração foi realizada com 119,56g de gordura em aparelho de Soxhlet utilizando o hexano como solvente durante 4 horas. Em seguida o hexano foi destilado em evaporador rotativo e posteriormente em banho-maria por 2 dias, obtendo rendimento de 27,39%. O conteúdo foi acondicionado e mantido em *freezer* para posteriores análises.

Determinação dos ácidos graxos

Os ácidos graxos foram determinados indiretamente utilizando os seus correspondentes ésteres metílicos. O óleo foi saponificado por 30 minutos sob o refluxo com solução de hidróxido de potássio em metanol, seguindo o método descrito por Hartman e Lago (1973). Depois de adequado tratamento e ajuste de pH, os ácidos livres foram metilados com metanol por catálise ácida, obtendo-se os respectivos ésteres metílicos.

Análise do óleo fixo de Spilotes pullatus por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

A análise dos constituintes voláteis do óleo foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplado à Espectrometria de Massas (CG/EM) Hewlett-Packard, modelo 5971, usando-se coluna capilar não-polar DB-1, de sílica fundida (30m x 0,25mm i.d., película de 0,25µm); carregado por gás hélio; velocidade de fluxo 0,8mL/min e modo de divisão. A temperatura do injetor e do detector foram 250°C e 200°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada de 35°C para 180°C em 4°C/min e em seguida 180°C para 250°C em 10°C/min. Os espectros de massas foram gravados a partir de 30 - 450m/z. Os componentes individuais foram identificados por correspondência de seus espectros de massa, 70eV, 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; 1990), bem como por comparação visual da fragmentação padrão com aqueles relatados na literatura (Stenhagen, 1974; Adams, 2001).

Resultados e Discussão

A análise da composição química do óleo fixo de *Spilotes pullatus* (OFSP) por CG/EM possibilitou a identificação, a partir dos ésteres metílicos de ácidos graxos, de dez constituintes, em 94,97% da amostra (Tabela 1). Do resultado encontrado, a prevalência refere a ácidos graxos insaturados representando um total de 61,38%, tendo como componente majoritário ácido eláidico (37,26%), seguido de ácido linoléico (17,28%). A porcentagem de ácidos graxos saturados foi de 33,59%, sendo mais expressivos ácido palmítico com 19,01% e ácido estereárico com 10,58% (Figura 3).

As proporções achadas dos ácidos saturados e insaturados seguem uma tendência de estudos anteriores da herpetofauna, como os de Ferreira et al. (2009, 2011) com *Tupinambis merianae* e com *Boa constrictor*, McCue (2008) com várias espécies de répteis e Sales (2012) com *Rhinella jimi*. Cabral (2012) testou duas espécies de anfíbios do gênero *Leptodactylus*, que divergiram quanto ao nível de saturação dos ácidos graxos, *Leptodactylus macrosternum* apresentou mais insaturação, porém em *L. vastus* os saturados sobressaíram.

Tabela 1 – Ésteres metílicos de ácidos graxos identificados do óleo de *Spilotes pullatus* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

Ácido graxo equivalente	TR (min)	(%)	Constituintes
Saturados			
Ácido mirístico	19,48	1,28	Miristato de metila
Ácido palmítico	22,97	19,01*	Palmitato de metila
Ácido estereárico	25,37	10,58*	Estereato de metila
Ácido nonadecílico	27,07	2,72	Nonadecanoato de metila
Insaturados			
Ácido palmitoleico	22,64	4,02	Palmitoleato de metila
Ácido linoleico	25,09	17,28*	Linoleato de metila
Ácido elaídico	25,12	37,26*	Elaidado de metila
Ácido araquídico	26,68	1,48	Araquidonato de metila
Ácido eicosanóico	26,85	0,88	Eicosa-7,10,13-trienoato de metila
Ácido docosahexaenóico	28,40	0,46	Docosahexaenoato de metila
TOTAL SATURADOS		33,59	
TOTAL INSATURADOS		61,38	
TOTAL GERAL		94,97	

(*) Ácidos graxos majoritários.

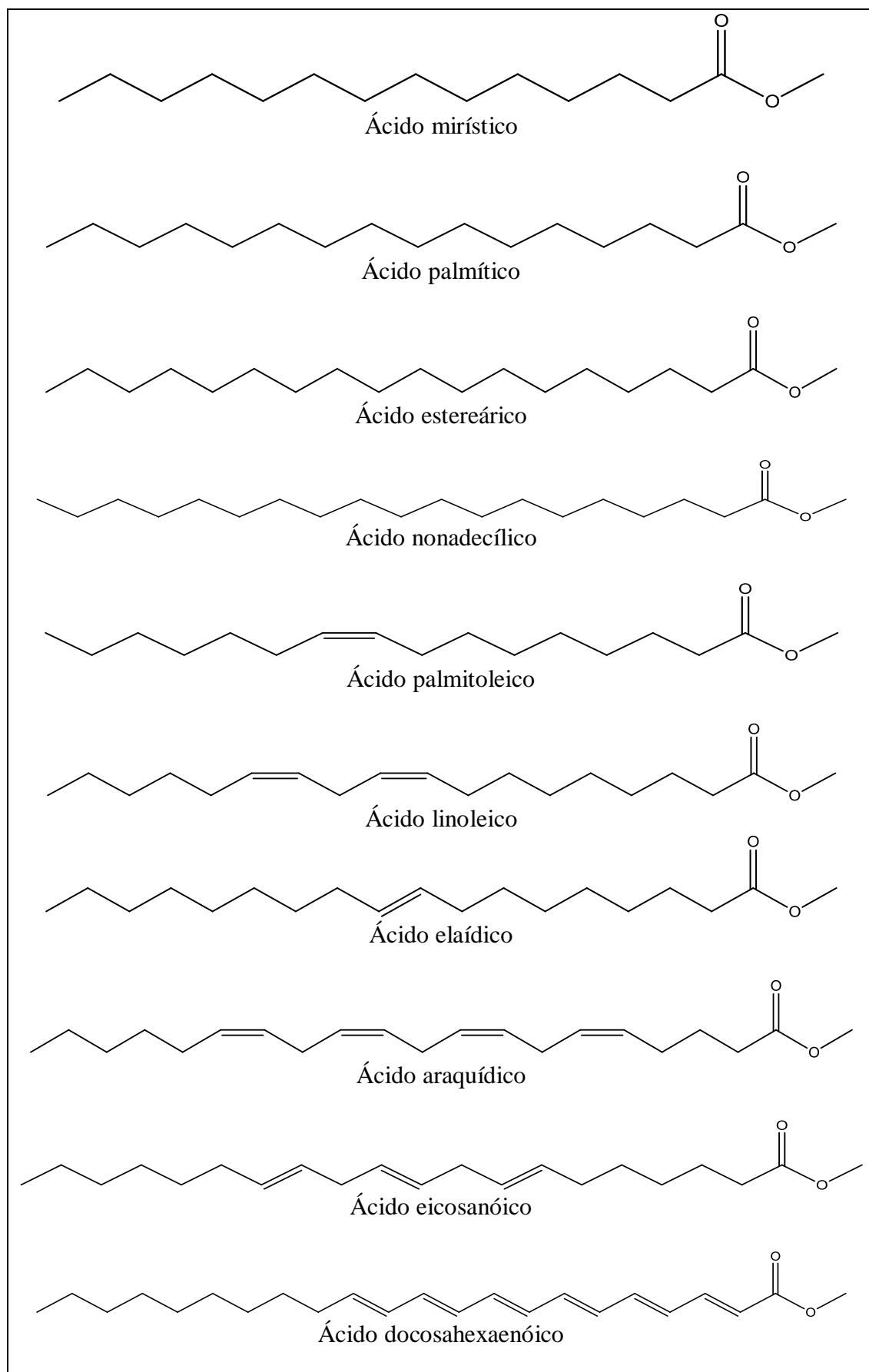


Figura 3 – Estruturas químicas dos ácidos graxos presentes no óleo fixo de *Spilotes pullatus*.

A presença dos ácidos mirístico, palmítico, estereárico, palmitoléico e linoleico já foi evidenciada anteriormente em outros estudos sobre a composição química da gordura corporal de animais (McCue, 2008; Cabral, 2012; Sales, 2012).

O composto majoritário do OFSP foi o ácido elaídico com 37,26%. Este é o isômero *trans* do ácido oleico, com apenas uma ligação dupla (Lottenberg, 2009). É originado principalmente no processo de hidrogenação industrial da gordura poli-insaturada (Lottenberg, 2009, Camolas e Sousa, 2010). Ácidos graxos *trans* estão associados com o aumento do colesterol total e redução do HDL, sendo fator prejudicial e agravante especialmente em doenças cardiovasculares (Cibeira e Guaragna, 2006; Bortolotto, 2007). Bray et al. (2002) acrescentam ainda que os ácidos graxos *trans* podem induzir a resistência à insulina de forma aguda.

Ácidos graxos, principalmente láurico, palmítico, linoleico, oleico, esteárico e mirístico são conhecidos por terem propriedades antibacterianas e antifúngicas (Agoramoorthy et al., 2007), sendo eficazes nesse controle por afetar a síntese bacteriana endógena de ácidos graxos, segundo Zheng et al. (2005). Nobre et al. (2002) ainda acrescentam que ácidos graxos orgânicos podem efetuar o controle de fungos, por modificar as condições locais. De acordo com Zheng et al. (2005) os ácidos graxos insaturados são mais eficazes no controle microbiano. Nessa perspectiva um maior índice de insaturação da gordura pode ser um indicativo para a comprovação de uma possível eficácia terapêutica.

PARTE II - Ensaios Microbiológicos

Introdução

A utilização de recursos animais constitui uma alternativa terapêutica importante (Alves et al., 2007b), sendo citada no combate de doenças que podem ter sido causadas por microrganismos patogênicos (Lima et al., 2006; Aguiar et al., 2008; Salvagnini et al., 2008). Uma preocupante realidade com o controle de bactérias e fungos é a resistência desenvolvida aos fármacos existentes, com perda de sua eficácia (Dias e Monteiro, 2010).

Visando auxiliar nesse controle, produtos zoterápicos podem vir a ser compostos potencialmente eficazes de forma direta ou associados a antibióticos sintéticos na tentativa de ampliar seu espectro de ação e minimizar os efeitos indesejáveis (Salvat et al., 2001; Gibbons, 2004; Shin e Pyun, 2004; Gurib-Fakim, 2006; Sousa et al., 2010). O desenvolvimento de novos medicamentos, bem como a bioprospecção por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais vem aumentando o interesse das companhias farmacêuticas (Duarte, 2006).

Um possível efeito antimicrobiano de recursos naturais isoladamente é investigado através do teste de concentração inibitória mínima (CIM), onde é registrada a menor concentração na qual o produto inibiu o crescimento bacteriano. Em outra perspectiva, a modulação avalia, através de uma associação do zoterápico com antimicrobianos, uma possível interferência na ação dos mesmos frente a cepas bacterianas e fúngicas.

Espécies de fungos do gênero *Candida*, embora façam parte da microbiota natural, podem tornar-se patogênica em casos como imunodeficiência congênita ou adquirida e imunossupressão induzida pelo estresse grave (Colombo e Guimarães, 2003; Dignani et al., 2003). Candidíase ou candidose é a infecção oportunista mais frequente causada por esse gênero (Portillo et al., 2001; Zhang et al., 2002). A dificuldade no tratamento está relacionada à aquisição de resistência, por parte de seus agentes etiológicos, frente à ação de antifúngicos (Araújo et al., 2004).

As bactérias são organismos simples encontrados em todos os ambientes, mas podem se tornar patogênicas e de difícil controle. De acordo com a constituição da parede celular

(como permeabilidade e componentes), podem ser classificadas em gram-positiva e gram-negativa. (Tortora et al., 2008).

Bactérias do gênero *Staphylococcus* são distribuídas na natureza, assim como na microbiota normal da pele e da mucosa, podendo se tornar patogênica, principalmente no caso de intoxicações e infecções oportunistas, humanas e hospitalares. (Nostro et al., 2004; Coutinho et al., 2009). *Staphylococcus aureus* é o agente etiológico mais comum causador de infecções. Seu controle torna-se mais difícil visto sua resistência a vários antibióticos (Coutinho et al., 2009).

Escherichia coli é a espécie mais comum do gênero *Escherichia*, sendo uma das principais causas de doenças infecciosas humanas, especialmente em pacientes imunossuprimidos. Está associada a infecções do trato urinário, bacteremia, meningite e diarreia (Bopp et al., 1999; Luciano et al., 2004; Murray et al., 2004).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, pertencente ao gênero que pode estar presente em organismos saudáveis, como também tornar-se nociva, desenvolvendo infecção em pessoas imunocomprometidas (Desimoni et al., 2004; Martinez, 2004). Está associada a infecções hospitalares e devido ao seu mecanismo de resistência às drogas, é de difícil controle (Keynan e Rubinstein, 2007).

Pseudomonas aeruginosa é responsável por uma variedade de infecções, sendo a principal causadora de infecções hospitalares, da pele, trato urinário, ouvidos e olhos. É muito resistente aos antibióticos mais comuns, explicando a dificuldade em seu controle (Murray et al., 2004).

Tendo em vista o acentuado uso da fauna na medicina popular, especialmente de répteis, além do aspecto conservacionista em relação à exploração excessiva dos recursos naturais, há a necessidade de isolar e comprovar suas propriedades farmacológicas, almejando uma otimização desses produtos, bem como uma possível justificativa para o seu uso na medicina tradicional.

Material e Métodos

Material Bacteriano

Nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima foram utilizadas bactérias de linhagens padrão *Escherichia coli* ATCC 10536, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4362. Para a modulação foram usados isolados clínicos multirresistentes de *E. coli* (EC 27), *S. aureus* (SA 358) e *P. aeruginosa* (PA 03), com origem e perfil de resistência identificados na Tabela 2. Todas as cepas foram mantidas em *Heart Infusion Agar* (HIA, Difco) e antes do ensaio foram colocados para crescimento, durante 24 horas a uma temperatura de 37° C, em *Brain Heart Infusion* (BHI, Difco) (Freitas et al., 1999; Coutinho et al., 2005). Todas as linhagens utilizadas foram doadas pela Universidade Federal da Paraíba.

Tabela 2 – Origem das linhagens e perfil de resistência das bactérias a antibióticos

Bactéria	Origem	Perfil de resistência
<i>Escherichia coli</i> 27	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob.
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Can, Neo, Para, But, Sis, Net.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Urocultura	Cpm, Ctz, Imi, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami.

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

Material Fúngico

Para a avaliação da atividade antifúngica foram utilizadas as linhagens de *Candida tropicalis* (13803), *Candida albicans* (40046) e *Candida krusei* (6258) que foram mantidos em HIA e armazenados a 4°C. Antes do ensaio, as células foram cultivadas para crescimento em BHI por 24 horas a 37°C.

Drogas

Os antifúngicos utilizados foram Nistatina, Anfotericina B, Mebendazol e Benzoilmetronidazol, na concentração de 1024µg/mL. Os antibióticos usados foram Amicacina, Gentamicina e Neomicina, estando a uma concentração de 5000µg/mL. Todos foram preparados de acordo com as indicações do fabricante.

Teste de atividades bactericida e fungicida

Para a realização do teste foi utilizada uma solução preparada em uma concentração de 100mg/mL de óleo solubilizados em 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, Darmstadt, Alemanha), posteriormente diluída em água destilada até uma concentração de 1024µg/mL.

Em uma placa de microdiluição com 96 poços, foi distribuído 100µL de cada uma das linhagens suspensas em BHI em cada poço e depositado 100µL da solução do óleo, em diluição seriada, tendo suas concentrações finais variando entre 512-8µg/mL. No controle negativo foi utilizado DMSO. Em seguida, as placas foram incubadas por 24h a 37°C (Javadpour et al., 1996). Para evidenciar o CIM das amostras bacterianas, foi preparada uma solução indicadora de resazurina, e colocada 20µL em cada poço. A mudança de coloração azul para rosa indica o crescimento bacteriano (Palomino et al., 2002). Para os fungos foi utilizada a técnica de turbidez, indicando crescimento.

Teste de suscetibilidade às drogas

Em uma placa de microdiluição foi semeado 100µL das linhagens microbianas em cada poço e posteriormente, através da técnica de diluição seriada, aplicadas as drogas correspondentes para cada tipo de microrganismo. A variação das concentrações dos antifúngicos foi de 1024-0,5µg/mL e dos antibióticos de 2500-1,22µg/mL. Em seguida foi acrescentado o produto animal na concentração determinada pela CIM. Posterior a isso, as placas foram incubadas por 24h a 37°C (Javadpour et al., 1996). A visualização do resultado foi semelhante à CIM.

Resultados e Discussão

O OFSP não inibiu o crescimento de fungos e bactérias em nenhuma das cepas utilizadas (Figura 4), revelando que esse produto isolado não tem nenhuma eficácia no controle de microrganismos. A ineficácia do OFSP sozinho no controle microbiano segue a tendência de estudos microbiológicos realizados anteriormente com óleo fixo extraídos da gordura corporal de representantes da fauna herpetológica, como o de Ferreira et al. (2009) com *Tupinambis merianae*, Sales (2012) com *Rhinella jimi* e Cabral (2012) com *Leptodactylus macrosternum* e *L. vastus*.

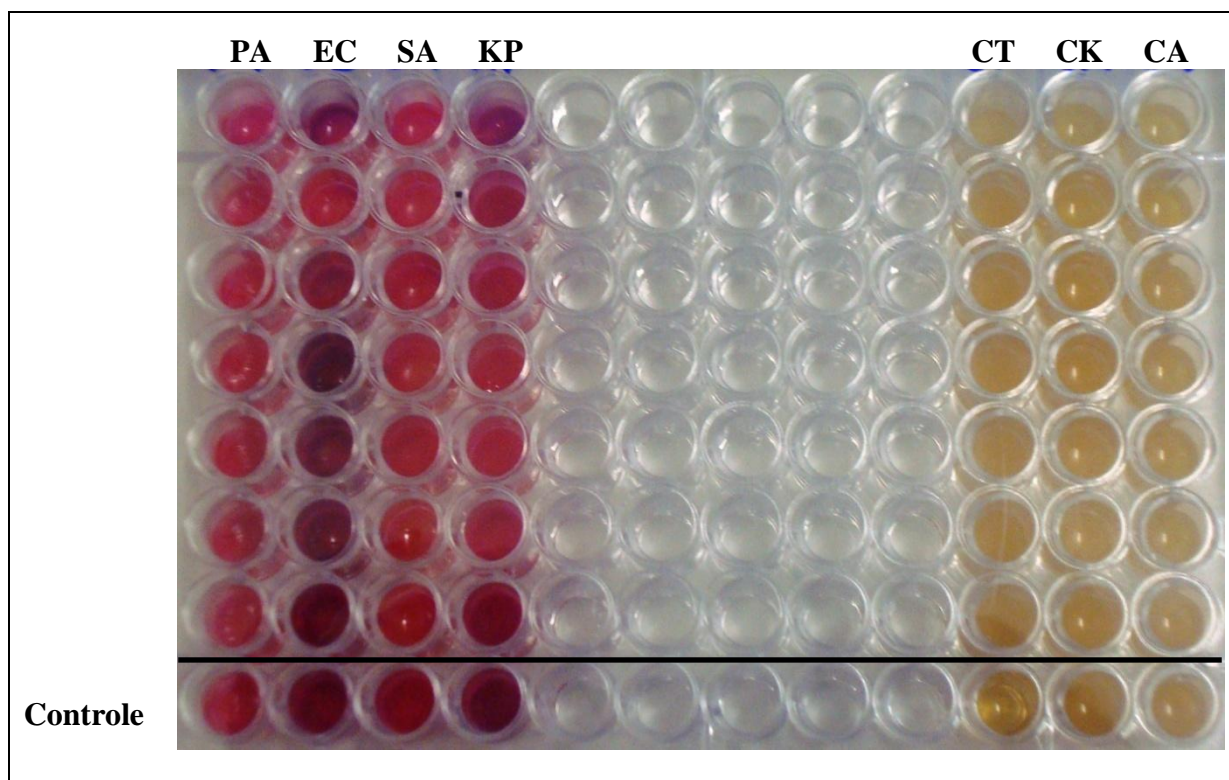


Figura 4 – Placa de microdiluição com resultados da concentração inibitória mínima, uma hora após a aplicação de resazurina. Na qual PA: *Pseudomonas aeruginosa*; EC: *Escherichia coli*; SA: *Staphylococcus aureus*; KP: *Klebsiella pneumoniae*; CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*. Foto da autora.

OFSP também foi testado em associação com antimicrobianos em cepas multirresistentes. Para os antifúngicos, não foi observada nenhuma atividade significativa, de acordo com o valor da CIM ≥ 1024 , para todas as linhagens testadas (Tabela 3).

Tabela 3 – Resultado do OFSP utilizado como modulador da ação dos antifúngicos microdiluídos, e o Controle, onde não foi utilizado o OFSP, todos os resultados em µg/mL. No qual CT: *Candida tropicalis*; CK: *Candida krusei*; CA: *Candida albicans*.

Antifúngicos	C.T. 13803		C.A.40046		C.K.6258	
	OFSP	Controle	OFSP	Controle	OFSP	Controle
Benzoilmetronidazol	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Anfotericina B	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Mebendazol	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
Nistatina	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024

A associação do OFSP com antibióticos demonstrou um efeito sinérgico quando combinado com a Gentamicina em todas as linhagens testadas. Para *Staphylococcus aureus* (SA 358) e *Pseudomonas aeruginosa* (PA 03) não foi evidenciada nenhuma interação clinicamente significativa com os antibióticos Amicacina e Neomicina. Entretanto, nas cepas de *Escherichia coli* (EC 27) um efeito antagônico foi observado para esses aminoglicosídeos (Tabela 4, Figura 5).

Tabela 4 – Valores da CIM (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e na presença do óleo de *S. pullatus* frente a *Staphylococcus aureus* 358 (SA 358) *Escherichia coli* 27 (EC 27) e *Pseudomonas aeruginosa* 03 (PA 03).

Antibióticos	SA 358		EC 27		PA 03	
	Controle	OFSP	Controle	OFSP	Controle	OFSP
Amicacina	39,06	39,06	9,76	78,125*	156,25	78,125
Gentamicina	39,06	2,44*	39,06	9,76*	39,06	9,76*
Neomicina	9,76	19,53	39,06	156,25*	625	312,5

(*) Resultados significativos.

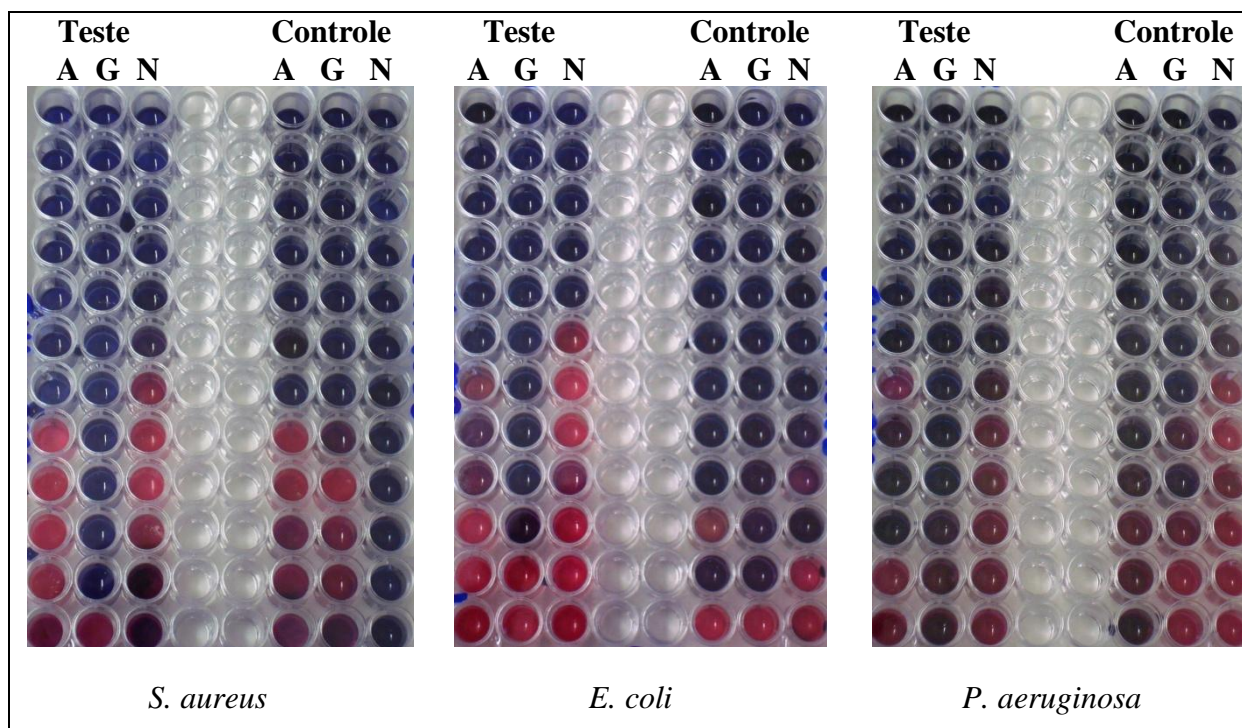


Figura 5 – Placas de microdiluição com resultados da modulação de antibióticos, uma hora após aplicado resarzurina. Da esquerda para a direita *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Na qual A – Amicacina; G – Gentamicina; N – Neomicina. Fotos da autora.

Esse resultado indica que OFSP, pode atrapalhar um tratamento de controle da bactéria *E. coli* realizado com o antibiótico Neomicina. Por outro lado, é clinicamente eficaz quando associado à Gentamicina, potencializando sua ação.

Conforme Agoramoorthy et al. (2007) e Nobre et al. (2002), ácidos graxos podem ser potentes agentes no controle microbiano. Ainda segundo Agoramoorthy et al. (2007), os ácidos palmítico, linoleico, esteárico e mirístico são conhecidos por seu poder antimicrobiano. Embora não observada nenhuma eficácia do OFSP quando utilizado sozinho, os resultados positivos associados ao seu uso combinado com aminoglicosídeos pode estar relacionado a este fato.

PARTE III - Ensaios Farmacológicos

Introdução

A inflamação aguda é uma resposta rápida a microrganismos ou à lesão tecidual, que envolve recrutamento local e ativação de neutrófilos. Uma falha nessa resposta de inibição pode levar a desregulação da homeostase, predispondo a uma inflamação crônica (Debenedictis et al., 2001). O óleo de cróton é extraído da planta *Croton tiglium* e pode causar irritação quando aplicado topicamente induzindo a inflamação local aguda. Com persistência do contato (aplicação múltipla), seu efeito torna-se semelhante a inflamação crônica.

A pele, maior órgão do corpo, está em contato com o meio externo e sujeita a processos nocivos de inflamação como lesões e invasão de patógenos (Sampaio et al., 2000). Com o desenvolvimento de alguns sinais inflamatórios como rubor (vermelhidão), calor, edema (inchaço) e dor (Serhan et al., 2008), células cutâneas, auxiliadas por vasos sanguíneos infiltrantes, exercem a função de proteção, desencadeando uma resposta a esses estímulos, permitindo a infiltração de células migratórias, como macrófagos e leucócitos (linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e monócitos), importantes na defesa inata ou imune (Ryan, 2004).

O estudo de modelos de inflamação cutânea em animais leva à identificação de compostos potencialmente úteis no tratamento de doenças inflamatórias da pele (Ferreira et al., 2010). Nessa perspectiva, produtos naturais são testados almejando um auxílio na ação anti-inflamatória através dos testes de edema de orelha induzido por óleo de cróton.

Material e Métodos

Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados com camundongos albinos (*Mus musculus*), de ambos os sexos, pesando entre 25-30g, cedidos pelo Biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte (FMJ). Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade Regional do Cariri (URCA) em caixas de polipropileno, com água (Labina, Purina®) e ração à vontade, obedecendo o fotoperíodo de 12 horas, com temperatura média 26°C.

Edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton

Para avaliar a atividade anti-inflamatória tópica de OFSP, em um processo agudo, os grupos de camundongos *Swiss* (n = 8), tiveram suas orelhas direitas pré-tratadas topicamente com 20µL do óleo de *S. pullatus*, dexametasona 4mg/mL (controle positivo) e solução salina 0,9% (controle negativo), sendo 10µL aplicados na face interna e externa, respectivamente. Após o tempo de absorção de quinze minutos, foi aplicado na orelha direita, o óleo de cróton 5% (v/v) em acetona e na orelha esquerda, para igualar o stress sofrido, aplicou-se o veículo acetona, sempre seguindo as mesmas medidas. Passadas 6h, tempo necessário para formação do edema, os camundongos foram sacrificados por decapitação, tendo círculos de 6mm de diâmetro retirados das orelhas, com o auxílio de um *Punch* (perfurador de couro metálico), para posterior avaliação do edema (Tubaro et al., 1985).

Edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton

O modelo de aplicação múltipla foi utilizado buscando verificar a eficácia do OFSP em um processo inflamatório pré-estabelecido. O edema foi induzido em grupos de camundongos *Swiss* (n = 8) pela aplicação, na orelha direita, de 20µL de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona em dias alternados, durante nove dias, seguindo-se sempre da aplicação do veículo acetona na orelha esquerda. A partir do quinto até o nono dia de experimento foram aplicados via tópica, duas vezes ao dia, o OFSP, dexametasona 4mg/mL (controle positivo) e solução salina 0,9% (controle negativo), estabelecendo-se 1 hora de intervalo entre as aplicações quando fosse também administrado o óleo de cróton (Tabela 5). A espessura da orelha foi medida diariamente próxima a extremidade medial com o auxílio de um paquímetro digital, sendo a variação da espessura indicativo do desenvolvimento do edema. No nono dia do experimento, passadas quatro horas do último tratamento, as orelhas foram mensuradas, os animais sacrificados e discos de 6mm de diâmetro foram coletados e pesados em balança analítica para avaliação do edema (Stanley et al., 1991).

Tabela 5 – Cronograma de execução do teste de edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton.

Dias	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°
MANHÃ	M	M	M	M	M	M	M	M	M
					T	T	T	T	T
					S	S	S	S	S
	OC		OC		OC		OC		OC
	A		A		A		A		A
TARDE	M	M	M	M	M	M	M	M	M
					T	T	T	T	T
					S	S	S	S	S
NOITE									M
									Sac

No qual M: medição; T: tratamento; S: solução salina; OC: óleo de cróton; A: acetona; Sac: sacrifício.

Quantificação do edema

A quantificação do edema foi calculada a partir da pesagem de discos de 6mm de diâmetro das orelhas direitas (mod) e esquerdas (moe), utilizando a seguinte fórmula:

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

O cálculo do efeito inibitório médio da inflamação (EIM) deu-se aplicando a fórmula a seguir, onde MPE_{trat} (em %) é a média do percentual de edema do grupo submetido a tratamento com OFSP, ou fármaco padrão e MPE_{cont} (em %) é a média do percentual de edema do grupo controle negativo (tratado com salina), conforme:

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

Análise estatística dos dados

Os resultados foram apresentados em média \pm erro padrão da média (EPM), dos diferentes grupos. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparados com o teste *post hoc* de Student Newmann-Keuls ($p < 0,05$) através do software *GraphPad Prism 5.0*.

Resultados e Discussão

A Figura 6 demonstra o efeito antiedematogênico do OFSP após 6 horas da aplicação tópica única de óleo de cróton em camundongos. Em relação ao controle negativo, dexametasona (controle positivo) e OFSP mostraram uma redução significativa do edema inflamatório. A redução do edema do grupo do OFSP ficou muito próxima quando comparada ao grupo da dexametasona, ambos com $p < 0,001$. O efeito inibitório médio da inflamação está demonstrado na Tabela 6.

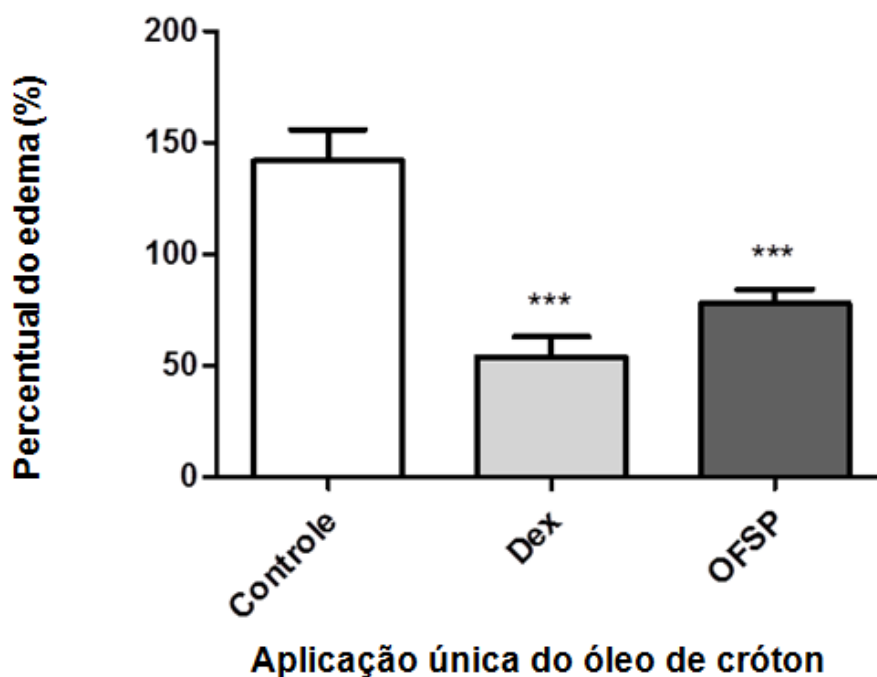


Figura 6 - Efeito tópico do óleo fixo de *Spilotes pullatus* (OFSP) sobre o edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss. Os animais foram pré-tratados com salina, 0,9% (Controle), dexametasona (DEX), OFSP e após 15 minutos, receberam topicamente solução de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através do edema calculado a partir das massas de discos de 6mm de diâmetro obtidos das orelhas após 6 horas de aplicação do óleo de cróton. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$ (***) $p < 0,001$ comparadas ao controle negativo. Análise estatística: ANOVA de uma via seguido do teste de Student-Newman-Keuls).

Tabela 6 – Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação única de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona e OFSP.

Tratamento	Óleo de Cróton	
	Percentagem do edema*	EIM (%)
Controle Negativo	141,82 ± 14,06	-
Dexametasona	53,74 ± 9,02	62,11%
OFSP	77,72 ± 6,28	45,20%

* Dados expressos em média ± erro padrão da média

Conforme observado na Figura 7, o tratamento tópico com OFSP e dexametasona (2 vezes ao dia, durante 4 dias), quando comparados ao grupo controle negativo, reduziram a espessura das orelhas dos camundongos a partir do sexto dia do início do teste, estendendo-se aos dias subsequentes. Quando relacionado o OFSP com o controle positivo, notou-se a maior eficácia anti-edematogênica da dexametasona. Ao final do experimento, confirmou-se a redução do edema da inflamação para os grupos do OFSP e da dexametasona ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente), com a confirmação do resultado evidenciado com a pesagem das orelhas no último dia de experimento, conforme observado na Figura 8. O efeito inibitório médio da inflamação está demonstrado na Tabela 7.

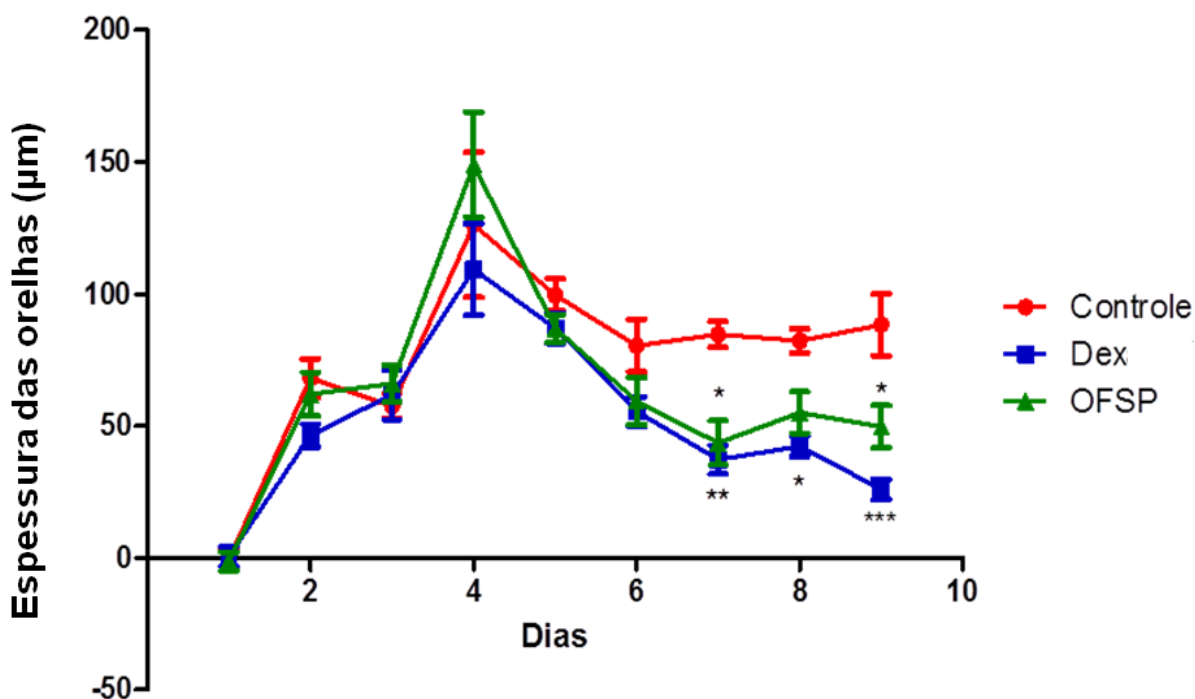


Figura 7 - Curva tempo-resposta do efeito do OFSP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss. Os animais receberam OC em acetona na orelha direita em dias alternados e veículo acetona na orelha esquerda. A espessura da orelha tratada com o agente flogístico foi mensurada com paquímetro digital antes da aplicação do OC, quatro horas após a primeira aplicação do OC (fase aguda) e nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 e 192 horas após a primeira aplicação do OC. No 5º dia do experimento (96 horas após a primeira aplicação de OC), a orelha direita de cada animal recebeu veículo salina (controle negativo), dexametasona (DEX) ou OFSP bruto (20µL, 2 vezes ao dia), prosseguindo o tratamento durante os 4 dias posteriores. O efeito antiedematogênico das substâncias foi analisado através da variação da espessura da orelha. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E. P. M. As médias foram comparadas com o grupo controle negativo e foram consideradas significativamente diferentes para $P < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparadas ao controle negativo, ANOVA de duas vias seguido do Teste de Bonferroni).

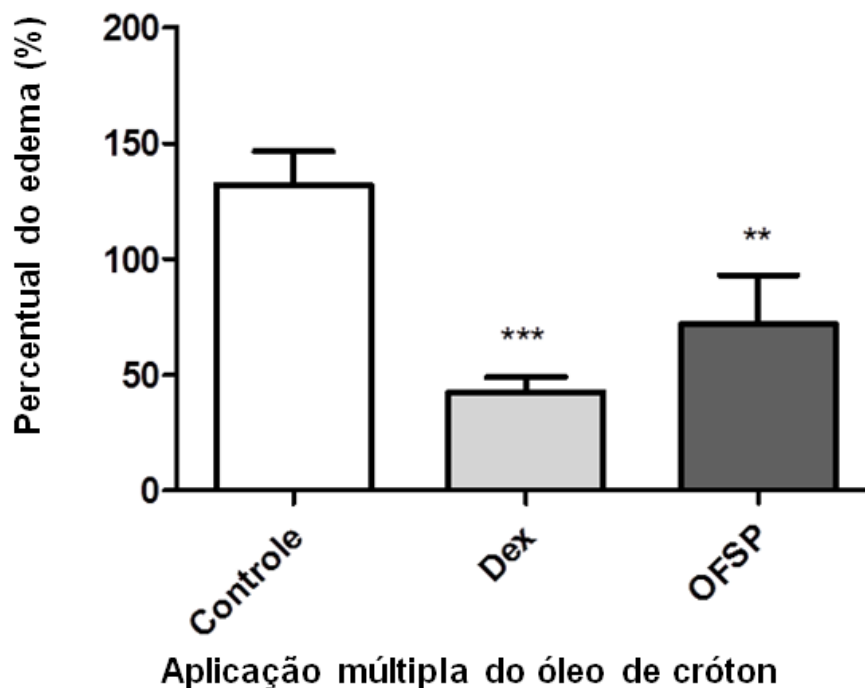


Figura 8 - Efeito tópico do óleo fixo de OFSP sobre o edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton (OC) em camundongos Swiss. A aplicação de OC foi conduzida em dias alternados, durante 9 dias. No 5º, 6º, 7º, 8º e 9º dias do experimento, a orelha direita de cada animal recebeu salina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

Tabela 7 – Porcentagem do edema de orelha induzido por aplicação múltipla de óleo de cróton em camundongos e o efeito inibitório médio (EIM) após aplicação tópica dos tratamentos Dexametasona e OFSP.

Tratamento	Óleo de Cróton	
	Porcentagem do edema*	EIM (%)
Controle Negativo	132,27 ± 14,5	-
Dexametasona	42,43 ± 6,62	67,92%
OFSP	71,85 ± 21,13	45,68%

* Dados expressos em média ± erro padrão da média

Vários outros estudos associam uma atividade anti-inflamatória aos ácidos graxos insaturados, apontando ainda sua eficácia em tratamentos de inflamação da pele (Calder, 2005; Das, 2006, 2008; Ferreira et al., 2010).

Os resultados obtidos seguem a tendência de estudos anteriores do caráter anti-inflamatório com gordura corporal de animais pertencentes à herpetofauna, apresentando resultados semelhantes aos de Ferreira et al. (2010) e Sales (2012). Esses estudos relacionam o caráter anti-inflamatório da gordura de *Tupinambis merianae* e *Rhinella jimi* com a presença do ácido linoléico. Esse fator também pode estar associado ao efeito antiedematogênico apresentado pelo OFSP, visto que a porcentagem de ácido linoéico presente em *Spilotes pullatus* (17,28%) supera as de *T. meriane* (15,89%) e *R. jimi* (8,98%).

O potencial terapêutico e avaliação clínica dos medicamentos tradicionais ainda são pouco estudados (Alves et al., 2009d). Apesar de demonstrada algumas utilidades farmacológicas de produtos derivados de animais, a efetiva utilização desses requer cautela e conhecimento mais aprofundado. Essa investigação faz-se necessária visto que produtos naturais são capazes de produzir reações adversas, como toxicidade, alergias e transmissão de zoonoses, com impactos a saúde ainda mais graves que a própria doença em tratamento (Alves e Rosa, 2005).

A conservação da diversidade biológica está intrinsecamente relacionada com a saúde humana. O caráter anti-inflamatório apresentado por *S. pullatus* remete a possibilidade da descoberta de novas drogas com o auxílio dos animais. Assim, o desenvolvimento de políticas de proteção a natureza ganha ainda mais importância com a comprovação farmacológica que a fauna é detentora de agentes potencias para a descoberta de novos fármacos.

CONCLUSÕES

Conclusões

1. O óleo da gordura de *Spilotes pullatus* apresentou ésteres metílicos correspondentes a variados ácidos graxos, sendo os insaturados em maior quantidade.
2. O óleo fixo de *S. pullatus* não apresentou nenhum efeito inibitório frente as linhagens fúngicas e bacterianas testadas.
3. A associação do óleo com antimicóticos não apresentou nenhuma atividade significativa. Quando combinado com antibióticos, demonstrou um efeito sinérgico com a Gentamicina em todas as linhagens testadas. Para *Escherichia coli* (EC 27) foi evidenciado um efeito antagônico com Amicacina e Neomicina.
4. O óleo da gordura de *S. pullatus* apresentou efeito anti-inflamatório tópico em processo de inflamação aguda e crônica no modelo animal estudado.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Adams, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001.
- Agoramoorthy, G.; Chandrasekaran, M.; Venkatesalu., H. M.J. Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. **Brazilian Journal of Microbiology**, 38: 739-742, 2007.
- Aguiar, J. S.; Costa, M. C. C. D.; Nascimento, S. C.; Sena, K. X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 436-440, 2008.
- Alencar, J. W.; Carneiro, A. A.; Matos, F. J. A. Kovats índices as a preselection routine in mass spectra library search of volatiles. **Journal of Natural Products**, 47: 890-892, 1984.
- Alencar, J. W.; Craveiro, A. A.; Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L. Kovats indices simulation in essential oils analysis. **Química Nova**, 13: 282-284, 1990.
- Almeida, C. F. C. B. R.; Albuquerque, U. P. Uso e conservação de plantas e animais medicinais no estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil): Um estudo de caso. **Interciência**, 27: 276–285, 2002.
- Alves, R. R. N. Use of marine turtles in zootherapy in Northeast Brazil. **Marine Turtle Newsletter**, 112: 16–17, 2006.
- Alves, R. R. N. Uso de invertebrados na medicina popular no Brasil. **Caderno de Cultura e Ciência**, 3: 43-51, 2007.
- Alves, R. R. N. Fauna used in popular medicine in Northeast Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 5: 1-11, 2009.
- Alves, R. R. N.; Rosa, I. L. Why study the use of animal products in traditional medicines? **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 1:1-5, 2005.
- Alves, R. R. N., Rosa, I. L. From cnidarians to mammals: the use of animals as remedies in fishing communities in NE Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 107: 259–276, 2006.
- Alves, R. R. N.; Rosa, I. L. Zootherapy goes to town: the use of animal-based remedies in urban areas of NE and N Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 113: 541–555, 2007.
- Alves, R. R. N.; Pereira-Filho, G. A. Commercialization and use of snakes on North and Northeastern Brazil: implications for conservation and management. **Biodiversity and Conservation**, 16: 969-985, 2007.
- Alves, R. R. N.; Santana, G. G. Use and commercialization of *Podocnemis expansa* (Schweiger 1812) (Testudines: Podocnemididae) for medicinal purposes in two communities in North of Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 4,(3): 6, 2008.

Alves, R. R. N.; Rosa, I. L.; Santana, G. G. The role of animal-derived remedies as complementary medicine in Brazil. **BioScience**, 57: 1-7, 2007a.

Alves, R. R. N.; Pereira Filho, G. A.; Lima, Y. C. C. Snakes used in ethnomedicine in Northeast Brazil. **Environment, Development and Sustainability**, 9: 455-464, 2007b.

Alves, R. R. N.; Lima, N. H.; Tavares, M. C.; Souto, W. M. S.; Barboza, R. R. D.; Vasconcellos, A. Animal-based remedies as complementary medicines in Santa Cruz do Capibaribe, Brazil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 8: 1-9, 2008a.

Alves, R. R. N.; Soares, T. C.; Mourão, J. S. Uso de animais medicinais na comunidade de Bom Sucesso, Soledade, Paraíba. **Sitientibus**, 8: 142-147, 2008b.

Alves, R. R.N.; Silva, C. C.; Alves, H. N. Aspectos sócio-econômicos do comércio de plantas e animais medicinais em área metropolitanas do Norte e Nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, 8: 181 – 189, 2008c.

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**, 6: 257-174, 2009a.

Alves, R. R. N.; Léo Neto, N. A.; 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**, 124: 600-608, 2009b.

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**, 5: 1-16, 2009c.

Alves, R. R. N.; Pereira-Filho, G. A.; Vieira, K. S.; Santana, G. G.; Vieira, W. L. S.; Almeida, W. O. Répteis e as populações humanas no Brasil: uma abordagem etnoherpetológica. IN: Alves, R. R. N.; Souto, W. M. S.; Mourão, J. S. **A etnozootologia no Brasil: importância, status atual e perspectivas**. Recife: NUPEEA, 2010.

Alves, R. R. N.; Souto, W. M. S. Etnozootologia: conceitos, considerações históricas e importância. IN: Alves, R. R. N.; Souto, W. M. S.; Mourão, J. S. **A etnozootologia no Brasil: importância, status atual e perspectivas**. Recife: NUPEEA, 2010.

Alves, R. R. N.; Silva, C. C.; Barboza, R. R. D.; Souto, W. M. S. Zooterapy as alternative therapeutic in South America. **Journal of Alternative Medicine Research** 1: 21-47, 2009d.

Alves, R. R. N.; Souto, W. M. S. Ethnozootology in Brazil: current status and perspectives. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 7: 1–19, 2011.

Alves, R. R. N.; Pereira-Filho, G. A.; Vieira, K. S.; Souto, W. M. S.; Mendonça, L. E. T.; Montenegro, P. F. G. P.; Almeida, W. O.; Vieira, W. L. S. A zoological catalogue of hunted reptiles in the semiarid region of Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**. 8: 1-40, 2012.

Alves, R. R. N.; Vieira, W. L. S.; Santana, G. G.; Vieira, K. S.; Montenegro, P. F. G. P. Herpetofauna used in traditional folk medicine: conservation implications, In: Alves, R. R.

N.; Rosa, I. L. **Animals in traditional folk medicine: implications for conservation**. 1. ed. New York/Dordrecht/London: Springer Berlin Heidelberg, 2013a.

Alves, R. R. N.; Santana, G. G.; Rosa, I. L.. The role of animal-derived remedies as complementary medicine in Brazil. In: Alves, R. R. N.; Rosa, I. L. **Animals in traditional folk medicine: implications for conservation**. 1. ed. New York/Dordrecht/London: Springer Berlin Heidelberg, 2013b.

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

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, 2002, 348p.

Baquero, F.; Blázquez, J. Evolution of antibiotic resistance, **Tree**, 12: 482-487, 1997.

Bernarde, P. S.; Abe, A. S. A snake community at Espigão do Oeste, Rondônia, Southwestern Amazon, Brazil. **South American Journal of Herpetology**, 1: 102-113, 2006.

Bérnils, R. S. & H. C. Costa (org.). 2011. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acessada em: 22/12/2011.

Bérnils, R. S. e H. C. Costa (org.). 2012. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.1. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Acessada em 09/10/2012.

Bisset, N. G. One man's poison, another man's medicine, **Journal of Ethnopharmacology**, 32: 71-81, 1991.

Bopp, C. A.; Brenner, F. W.; Well, J.; Strockbine, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. **Manual of clinical microbiology**. ASM Press Washington, DC, 7 ed. P. 459-465, 1999.

Brandão, P. A.; Costa, F. G. P.; Barros, L. R.; Nascimento, G. A. J. Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Agropecuária Técnica**, 26: 5 - 14, 2005.

Bray, G. A.; Lovejoy, J. C.; Smith, S. R.; DeLany, J. P.; Lefevre, M.; Hwang, D.; Ryan, D. H.; York, D. A. The influence of different fats and fatty acids on obesity, insulin resistance and inflammation. **The Journal of Nutrition**, 132: 2488-2491, 2002.

Bortolotto, J. W. **Determinação de ácidos graxos trans e modulação de receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPARs) em tecido adiposo de obesos e não obesos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

Cabral, M. E. S. **Identificação Química, Análise Microbiológica e Farmacológica das gorduras corporais de *Leptodactylus macrosternum* (Miranda-Ribeiro, 1926) e *Leptodactylus vastus* (Adolf Lutz, 1930) da Região do Cariri**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) – Universidade Regional do Cariri – URCA, 2012.

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

Colombo, A. L.; Guimarães, T. Epidemiologia das infecções hematogênicas por *Candida* spp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36: 599-607, 2003.

Camolas, J. M. L.; Sousa, J. C. Ingestão de gordura e doença cardiovascular: conclusões. **Revista Factores de Risco**, 16: 72-75, 2010.

Cibeira, G. H.; Guaragna, R. M. Lipídio: fator de risco e prevenção do câncer de mama. **Revista de Nutrição**, 19: 65-75, 2006.

Costa, H. C.; Pantoja, D. L.; Pontes, J. L.; Feio, R. N. Serpentes do município de Viçosa, Mata Atlântica do Sudeste do Brasil. **Biota Neotropica**, 10: 353-377, 2010.

Costa Neto, E. M.; Alves, R. R. N. Estado da arte da zooterapia popular no Brasil. IN: Costa Neto, E.M.; Alves, R. R. N. **Zooterapia: os animais na medicina popular brasileira**. Recife: NUPEEA, 2010.

Costa Neto, E. M. Traditional use and sale of animals as medicines in Feira de Santana City, Bahia, Brazil. In: **Indigenous Knowledge and Development Monitor**, 1999.

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

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

Coutinho, H. D. M.; Costa, J. G. M.; Siqueira-Jr, J. P.; Lima, E. O. Effect of *Momordica charantia* L. in the resistance to aminoglycosides in ethicilinresistant *Staphylococcus aureus*. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 33: 467-471, 2009.

Daferera, D. J.; Ziogasb, B. N.; Polissiou, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, 22: 39-44, 2003.

Das, U.N.. Essential fatty acids - a review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 7: 3-19, 2006.

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

Debenedicts, C.; Joubeh, S.; Zhang, G.; Barria, M., Ghohestani, R. F. Immune functions of the skin. **Clinical Dermatology**, 19: 573-585, 2001.

Desimoni, M. C.; Esquivel, G. P.; Merino, L. A. Fecal colonization by extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, 22: 507-11, 2004.

Dias, M.; Monteiro, M. S. Antibióticos e resistência bacteriana, velhas questões, novos desafios. **Cadernos Otorrinolaringologia: clínica, investigação e inovação**. Dez. 2010. 12p.

Dignani, M. C.; Solomkin, J. S.; Anaissie, E. *Candida*. In: Anaissie, E.; Ginnis, M. R.; Pfaller, M. A. **Medical Mycology**. Filadélfia, p. 195-239, 2003.

Duarte, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, 7: 1 – 16, 2006.

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

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

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

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

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

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 Goeldi**, 8: 65-156 Série Antropologia, 1993.

França, F. G. R.; Araújo, A. F. B. Are there co-occurrence patterns that structure snake communities in Central Brazil? **Brazilian Journal of Biology**. 67: 33-40, 2007.

França, F. G. R.; Mesquita, D. O.; Nogueira, C. C.; Araújo, A. F. B. Phylogeny and ecology determine morphological structure in a snake assemblage in the central Brazilian Cerrado. **Copeia**, 2008: 23-38, 2008.

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

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

Gibbons, J. W.; Scott, D. E.; Ryan, T. J. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. **BioScience**. 50: 653–666, 2000.

- Gurib-Fakim, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of medicine**, 27: 91-93, 2006.
- Harvey, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**. 13: 894-901, 2008.
- Hartman, L.; Lago, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, 22: 475-477, 1973.
- Henderson, J.; Harrington, J. P. Ethnozoology of the Tewa Indians. **Bureau of American Ethnology Bulletin**, 56: 1-76, 1914.
- Hunt, B.; Vincent, A. C. J. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. **Ambio**. 35: 57-64, 2006.
- Javadpour, M. M.; Juban, M. M.; Lo, W. C.; Bishop, S. M.; Alberty, J. B.; Cowell, S. M.; Becher, C. L.; McLaughlin, M. L. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal Medical Chemistry**. 39: 3107-3113, 1996.
- Keynan, Y., Rubinstein, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 30: 385-389, 2007.
- Lima, D. C. O. **Conhecimentos e práticas populares envolvendo insetos na região em torno da Usina Hidrelétrica de Xingo** (Sergipe e Alagoas). Monografia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil, 56 pp., 2000.
- Lima, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Farias, N. M. P.; Sou-Za, E. L. Antifungal activity from essential oils on *Candida* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16: 197-201, 2006.
- Lottenberg, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia Metabólica**, 53: 595-608, 2009.
- Luciano, E. P.; Ribeiro, M. F. I.; Torres, T. M. et al. Análise retrospectiva de infecções do trato urinário, estudo epidemiológico de cinco anos. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 414-457, 2004.
- Mason, O. T. Aboriginal american zootechny. **American Anthropologist**, 1: 45-81, 1899.
- McCue, M. D.; Fatty acid analyses may provide insight into the progression of starvation among squamate reptiles. **Comparative Physiology and Biochemistry**, 151: 239-246, 2008.
- Marques, J. G. W. A fauna medicinal dos índios Kuna de San Blas (Panamá) e a hipótese da universalidade zoterápica. In: **Anais da 46a Reunião Anual da SBPC**. Vitória, Brasil, 1994.
- Marques, J. G. W. Fauna medicinal: Recurso do ambiente ou ameaça à biodiversidade? **Mutum**. 1: 4, 1997.

Marques, O. A. V.; Eterovick, A.; Sazima, I. **Serpentes da Mata Atlântica: guia ilustrado para a Serra do Mar**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001.

Marques, O. A. V.; Sazima, I. História natural dos répteis da Estação Ecológica Juréia-Itatins. In: Marques, O. A. V.; Sazima, I. **Estação Ecológica Juréia-Itatins: ambiente físico, flora e fauna**. Ribeirão Preto: Holos, 2004.

Martinez, J.; Martinez, L.; Rosenblueth, M.; Silva, J.; Martinez-Romero, E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, 7: 261-8, 2004.

Mendonça, P. P.; Cobra, P.; Bernardo, L. R.; Silva-Soares, T. Predation of the snake *Spilotes pullatus* (Squamata: Serpentes) upon the rodent *Proechimys gardneri* (Rodentia: Echimyidae) in the Amazonian basin, Northwestern Brazil. **Herpetology Notes**, 4: 425-427, 2011.

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

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

Nostro, A.; Blanco, A. R.; Cannatelli, M. A.; Enea, V.; Flamini, G.; Morelli, I. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, 230: 191–195, 2004.

Palomino, J. C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46: 2720-2722, 2002.

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

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

Ribeiro, G. C.; Pereira, J. P. R.; Docio, L.; Alarcon, D. T.; Schiavetti, A. Zooterápicos utilizados no sul da Bahia. IN: Costa Neto, E.M.; Alves, R. R. N. **Zooterapia: os animais na medicina popular brasileira**. Recife: NUPEEA, 2010.

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

Sales, D. L. **Identificação química e avaliação das atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo fixo extraído da gordura de *Rhinella jimi* (Stevaux, 2002) (Anura: Bufonidae)**. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) - Universidade Regional do Cariri – URCA, 2012.

Salvagnini, L. E.; Oliveira, J. R. S.; Santos, L. E.; Moreira, R. R. D.; Pietro, R. C. L. R. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 18: 241-244, 2008.

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

Sampaio, S. A. P.; Castro, R. M.; Rivitti, E. A. **Dermatologia Básica**, 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 1-5, 2000.

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

Santos-Fita, D.; Costa Neto, E. M. Schiavetti, A. 'Offensive' snakes: cultural beliefs and practices related to snakebites in a Brazilian rural settlement. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, 6: 1-13, 2010.

Sassi, R.; Cabral, A. L.; Costa, C. F. Pescadores artesanais do estuário do rio Timbó, Pernambuco, Brasil: cultura, sobrevivência e imaginário. **Sítientibus Série Ciências Biológicas**, 7: 86-97, 2007.

Serhan, N. C.; Chiang, N.; Dyke, T. E. V. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, 8: 349-361, 2008.

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

Silva, A. L. Animais medicinais: conhecimento e uso entre as populações ribeirinhas do rio Negro, Amazonas, Brasil. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, 3: 343-357, 2008.

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

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

Souto, F. J. B.; Andrade, C. T. S.; Souza, A. F. A. **Uma abordagem etnoecológica sobre a zooterapia na medicina popular em Andaraí, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil**. In: Anais do Encontro Baiano de Etnobiologia e Etnoecologia, Feira de Santana-BA, 2001.

Stanley, P. L.; Steiner, S.; Havens, M.; Transposch, K. M. Mouse skin inflammation induced by multiple topical application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Journal of Pharmacological and Biophysiological Research**, 4: 3-9, 1991.

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

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

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

Vianni, R.; Braz-Filho, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, 19: 400-407, 1996.

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

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

ANEXOS

ANEXO I



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29838-1	Data da Emissão: 19/08/2011 14:17
-----------------	-----------------------------------

Dados do titular

Nome: Samuel Cardozo Ribeiro	CPF: 010.038.123-50
Título do Projeto: Estrutura de comunidades de répteis e anfíbios da Chapada do Araripe	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Pesquisa Científica	07/2011	12/2013

De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

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

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Waltécio de Oliveira Almeida	Pesquisador, Parasitologista	572.981.651-00	2608186 SSP-PB	Brasileira
2	Daniel Oliveira Mesquita	Orientação, Pesquisa, Herpetologista	196.288.298-58	29427850-3 SSP-SP	Brasileira
3	João Antonio de Araujo Filho	Pesquisa, Apoio	100.938.194-63	8.748.426 SDS-PE	Brasileira
4	JOSÉ GUILHERME GONÇALVES DE SOUSA	Pesquisa, Apoio	030.444.143-00	2004034084316 SSP-CE	Brasileira
5	Robson Waldemar Ávila	Pesquisa, Parasitologista, Herpetologista	272.249.088-94	28716304-0 SSP-SP-SP	Brasileira
6	Diêgo Alves Teles	Pesquisa, Apoio	043.935.763-22	2004034065443 SSPDS-CE	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	CRATO	CE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CHAPADA DO ARARIPE	UC Federal
2	BARBALHA	CE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CHAPADA DO ARARIPE	UC Federal
3	CRATO	CE	FLORESTA NACIONAL DE ARARIPE-APODI	UC Federal
4	EXU	PE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CHAPADA DO ARARIPE	UC Federal
5	VARZEA ALEGRE	CE	Propriedade particular	Fora de UC

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa n°154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 35395555



Página 1/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29838-1	Data da Emissão: 19/08/2011 14:17
Dados do titular	
Nome: Samuel Cardozo Ribeiro	CPF: 010.038.123-50
Título do Projeto: Estrutura de comunidades de répteis e anfíbios da Chapada do Araripe	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Anura, Amphisbaenidae, Anguidae, Boidae, Colubridae, Elapidae, Gekkonidae, Gymnophthalmidae, Iguanidae, Leptotyphlopidae, Polychrotidae, Scincidae, Teiidae, Tropiduridae, Typhlopidae, Viperidae
2	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Viperidae (*Qtde: 10), Anguidae (*Qtde: 30), Teiidae (*Qtde: 30), Polychrotidae (*Qtde: 30), Leptotyphlopidae (*Qtde: 10), Gymnophthalmidae (*Qtde: 30), Tropiduridae (*Qtde: 30), Scincidae (*Qtde: 30), Iguanidae (*Qtde: 5), Gekkonidae (*Qtde: 30), Elapidae (*Qtde: 10), Boidae (*Qtde: 4), Amphisbaenidae (*Qtde: 20), Colubridae (*Qtde: 10), Anura (*Qtde: 20), Typhlopidae (*Qtde: 10)
3	Observação e gravação de imagem ou som	Viperidae, Typhlopidae, Tropiduridae, Teiidae, Scincidae, Polychrotidae, Leptotyphlopidae, Iguanidae, Gekkonidae, Gymnophthalmidae, Elapidae, Colubridae, Boidae, Anguidae, Amphisbaenidae, Anura

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Anfíbios)	Captura manual, Armadilha de queda "pit fall", Puçá, Peneira
2	Método de captura/coleta (Répteis)	Estilingue, Outros métodos de captura/coleta (Arma de pressÃo), Elástico, Coleta manual, Puçá, Armadilha de queda "pit fall", Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Universidade Regional do Cariri	coleção
2	UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA	coleção

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

Código de autenticação: 35395555



Página 2/3



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29838-1	Data da Emissão: 19/08/2011 14:17
Dados do titular	
Nome: Samuel Cardozo Ribeiro	CPF: 010.038.123-50
Título do Projeto: Estrutura de comunidades de répteis e anfíbios da Chapada do Araripe	
Nome da Instituição : UFPB - UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	CNPJ: 24.098.477/0001-10

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

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

Código de autenticação: 35395555



Página 3/3



PARECER DO RELATOR DA CEUA

Processo n° 46 /2012

Título do Projeto de Pesquisa: Análise química e estudo experimental (microbiológico e farmacológico) do óleo fixo de *Spilotes pullatus* (Linnaeus, 1758) na medicina popular no Nordeste brasileiro

Pesquisadores: Waltécio de Oliveira Almeida (Pesquisador Orientador)

Olga Paiva Oliveira (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: *Mus musculus*

Número Amostral: 180

Redução Amostral:

Sim Não

Justifique:





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 *Spilotes pullatus* para o tratamento de infecções e inflamações. Os estudos envolvendo produtos naturais de origem animal são escassos 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*), com média de peso entre 20-

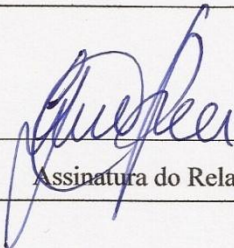


30g e divididos em 18 grupos diferentes. Os animais serão obtidos do biotério da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – CE e mantidos em regime *ad libitum* de água e ração, em ciclo claro e escuro de 12/12h. O experimento consiste no tratamento tópico do óleo fixo em diferentes concentrações em uso agudo e crônico segundo metodologia de Gabor 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, 29 de Novembro de 2012.


Assinatura do Relator da CEUA