



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA

Jéssica Vieira Martins Pinto

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana Shaw*).**

Juiz de Fora

2018

Jéssica Vieira Martins Pinto

**EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana Shaw*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Graduação em Farmácia, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fabiano Freire Costa

Co-orientadora: Pro^a. Dr^a. Fabíola Dutra Rocha

Juiz de Fora

2018

“O Senhor é a minha força e o meu escudo; nele o meu coração confia, e dele recebo ajuda. Meu coração exulta de alegria, e com o meu cântico lhe darei graças.” Salmos 28:7

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pela autora

Pinto, Jéssica Vieira Martins.

EXTRAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE RÃ-TOURO (*Rana catesbeiana* Shaw). / Jéssica Vieira Martins Pinto. 2018. 47 f.: il.

Orientador: Fabiano Freire Costa

Coorientadora: Fabíola Dutra Rocha

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2018.

1. Extração. 2. Caracterização. 3. Avaliação da atividade antioxidante. I. Costa, Fabiano Freire, orient. II. Rocha, Fabíola Dutra, coorient.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tornar tudo possível. Por me dar vida, ânimo e perseverança para não desanimar. Por cuidar de mim, por se mostrar e fazer presente a todo o momento sempre guiando meus passos e iluminando meus caminhos, além de prover todas as bênçãos, proteção e sabedoria.

Aos meus pais Deluz e Mirian, meus irmãos Kassiana e Vinicius, por todo amor, paciência, cuidado e carinho, pelo acompanhamento constante e pelas alegrias compartilhadas tornando mais serena a caminhada, pelo apoio e força que nunca deixaram faltar durante todo tempo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabiano Freire Costa que prontamente se interessou e se dispôs a me auxiliar orientando e incentivando em todos os momentos, tornando possível a execução deste trabalho. Agradeço pela importância e dedicação, pela confiança depositada em mim.

À minha co-orientadora Prof^{ra}. Dr^a. Fabíola Dutra Rocha que me proporcionou toda atenção, carinho e suporte, me ensinando e disponibilizando sua equipe para que fosse possível a realização dos testes e obtenção dos resultados deste trabalho. Agradeço imensamente, pois serviu de grande aprendizado e sem isso nada teria sido possível.

A toda equipe do Laboratório de Farmacognosia, em especial a Ana Carolina Reis e Nayara Filgueiras, por todo carinho, atenção e pela grande ajuda que, sempre tão dispostas, se fizeram presentes me ajudando a realizar e superar cada etapa e cada obstáculo dos experimentos.

Ao meu querido amigo Jean Marinho, que sempre esteve comigo na hora do desespero, me alimentando com o pão doce de cada dia e nos inúmeros momentos de alegria, os quais se tornaram frequentes com sua presença, carinho e importância que dedicou a mim. A você o meu eterno obrigada.

À equipe da Farmácia Universitária que me acolheram com tanto carinho, que acreditaram em mim, me motivaram e proporcionaram momentos de grande felicidade.

Aos demais colaboradores da Faculdade de Farmácia-UFJF que de alguma forma se fizeram presentes nesta caminhada.

RESUMO

Os óleos e gorduras são substâncias lipídicas compostas por moléculas de ácidos graxos. Esses produtos possuem grande funcionalidade nutricional e terapêutica, por isso atualmente tem-se buscado a realização de estudos a fim de elucidar seus possíveis mecanismos de ação. Há relatos em fontes literárias que os ácidos graxos insaturados possuem boa atividade antiinflamatória, cicatrizante e antitumoral. Por esse motivo, o óleo de rã-touro tem se tornado um potencial alvo de pesquisas científicas, pois ele é obtido a partir do tecido adiposo do anfíbio *Rana catesbeiana* Shaw sendo totalmente descartado pelos criatórios. O reaproveitamento biotecnológico do tecido adiposo deste animal possui um enorme potencial terapêutico, pois possibilita o desenvolvimento de novas formulações cosméticas, farmacêuticas e nutracêuticas à base de óleo de rã-touro. Em virtude disso, o objetivo deste trabalho foi extrair, caracterizar e testar a atividade antioxidante deste óleo.

Palavras chave: *Rana catesbeiana* Shaw, óleo de rã-touro, ácidos graxos, atividade antioxidante.

ABSTRACT

Oils and fats are lipid substances composed of fatty acid molecules. These products have great nutritional and therapeutic functionality so we have currently sought to carry out studies in order to elucidate their possible mechanisms of action. There are reports in literary sources that unsaturated fatty acids have good anti-inflammatory, healing and anti-tumor activity. For this reason, bullfrog oil has become a potential target for scientific research as it is derived from the adipose tissue of the amphibian *Rana catesbeiana* Shaw being totally discarded by the breeding grounds. The biotechnological reuse of the adipose tissue of this animal has an enormous therapeutic potential, as it allows the development of new cosmetic, pharmaceutical and nutraceutical formulations based on bullfrog oil. As a result, the objective of this work was to extract, characterize and test the antioxidant activity of this oil.

Key words: *Rana catesbeiana* Shaw, frog-bull oil, fatty acids, antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Rã-touro (<i>Rana catesbeiana</i> Shaw).....	14
Figura 2: Ciclo reprodutivo da rã-touro	15
Figura 3: Esquema simplificado do circuito de análise em CG.....	23
Figura 4: Mecanismo e avaliação da peroxidação lipídica em amostras biológicas.....	26
Figura 5: Tecido adiposo (a) e óleo de rã-touro (b).....	29
Figura 6: Curva da determinação da atividade antioxidante para as diferentes concentrações de amostras do óleo de rã-touro utilizando o sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	38
Figura 7: Atividade antioxidante dos extratos de linhaça marrom em volumes de 100 μL.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ácidos graxos presentes no óleo extraído do tecido adiposo da rã-touro.....	20
Tabela 2: Perfil de ácidos graxos (porcentagem).....	33
Tabela 3: Variações de dados literários sobre a composição do tecido adiposo de rã-touro..	35
Tabela 4: Resultados das análises antioxidantes em porcentagem de inibição das amostras do óleo de rã-touro (média± DP; n=2).....	36

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

EPA	Ácido eicosapentaenoico
DHA	Ácido docosapentaenóico
AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGE:	Ácido graxo essencial
AGI:	Ácido graxo insaturado
AGMI:	Ácido graxo monoinsaturado
AGS:	Ácido graxo saturado
β:	Beta
CG:	Cromatografia gasosa
EtOH	Etanol
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
°C	Graus célsius
min.	Minutos
mL	Mililitro
μL/mL	Microlitro por mililitro
μg	Micrograma
mg	Miligrama
R·	Radical lipídico
ROO·	Radical peroxila
®	Registrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Rã-touro.....	14
2.2 Óleos e gorduras	16
2.3 Lipídios e Triacilgliceróis.....	17
2.4 O óleo de Rã-touro e seu uso terapêutico	19
2.5 Reaproveitamento biotecnológico dos resíduos oriundos do abate de rã-touro	21
2.6 Possibilidade de produtos a serem desenvolvidos à base de óleo de rã-touro.....	21
2.7 Caracterização por Cromatografia com fase Gasosa.....	22
2.8 Métodos de extração e caracterização de óleos.....	23
2.9 Peroxidação lipídica	25
2.10 Atividade antioxidante	26
2.10.1 <i>Avaliação in vitro do potencial antioxidante.....</i>	<i>28</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 <i>Amostra, Reagentes e Soluções</i>	<i>29</i>
3.2 <i>Extração do óleo de Rana catesbeiana Shaw.....</i>	<i>29</i>
3.3 <i>Extração e caracterização química do óleo de rã-touro por CG.....</i>	<i>30</i>
3.3.1 <i>Preparo de amostra: hidrólise e metilação de óleos.....</i>	<i>30</i>
3.3 <i>Teste antioxidante.....</i>	<i>31</i>
3.3.1 <i>Tratamento da água destilada.....</i>	<i>31</i>
3.3.3 <i>Emulsão β-caroteno/ ácido Linoleico</i>	<i>31</i>
3.3.4 <i>Preparo das soluções de óleo de rã-touro.....</i>	<i>31</i>
3.3.5 <i>Preparo da solução controle</i>	<i>31</i>
3.3.6 <i>Preparo da emulsão controle e dos brancos</i>	<i>32</i>
3.4 Determinação da atividade antioxidante.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42

1 Introdução

Atualmente, um dos maiores problemas que o país enfrenta é a grande quantidade de resíduos gerados pela própria sociedade em que vivemos, e isso caracteriza grandes impactos ambientais, econômicos e sociais. O aumento do número de habitantes e a grande variedade de produtos disponíveis no mercado promovem o consumo exacerbado originando quantidades assustadoras de resíduos sólidos, os quais grande parte não passa por processo de reciclagem e nem recebem tratamento adequado para o descarte, além de haver a ausência e a dificuldade para disponibilizar áreas propícias com infraestrutura e dimensões apropriadas (QUERINO; PEREIRA, 2006; AMBIENTE, 2018).

Uma das atividades econômicas exercida no Brasil é a ranicultura que teve início no país aproximadamente no ano de 1930. A partir da fácil adaptação da rã-touro (*Rana catesbeina* Shaw), esta prática econômica se difundiu por todo o país tornando-se fonte de renda para muitos criadores e indústrias alimentícias. A rã é um anfíbio com hábitos compatíveis com o clima tropical e cuja carne é muito apreciada para o consumo devido ao sabor e qualidade nutricional. Por isso os ranicultores utilizavam apenas a carne como principal produto. Em algumas regiões, o couro era utilizado em alguns processos industriais na fabricação de acessórios, porém se tratava de um processo bem raro. Além do couro, o abate do animal gerava muitos resíduos que não eram aproveitados, como a carcaça, o couro e o corpo gorduroso, sendo este último o responsável pela composição por grande parte do corpo da rã-touro (FERREIRA *et al.*, 1997; MACHADO, 2015; QUERINO; PEREIRA, 2006).

Tendo como base a cultura nacional e a diversidade de recursos naturais com grande potencial farmacológico, vem crescendo cada vez mais o interesse das indústrias em pesquisas sobre substâncias ativas extraídas de fontes naturais. Isso motiva o desenvolvimento de uma infinidade de produtos com fins farmacológicos, cosméticos e nutricionais, o que garante a existência de terapias alternativas para determinadas patologias além de movimentar a economia e aumentar o lucro para o setor fabril (CUNHA; DELARIVA, 2009; MACHADO *et al.*, 2016; QUERINO; PEREIRA, 2006).

A medicina popular tornou o uso de óleos naturais uma prática muito comum para o tratamento de patologias, feridas, distúrbios imunológicos e processos inflamatórios. Tendo como base materiais literários já publicados, verifica-se que produtos ricos em ácidos graxos estão tornando-se uma nova possibilidade para o tratamento de pacientes com complicações dermatológicas. Dentre estes produtos, o óleo de rã-touro teve sua atividade e uso relatado e vem mostrando-se como uma boa alternativa no tratamento de asma, feridas e inflamações

cutâneas e regeneração tecidual. Este óleo é extraído do tecido adiposo da rã e apresenta-se como uma fonte renovável de baixa toxicidade e biodegradável, podendo ser empregado em diversos tipos de formulações cosméticas e farmacêuticas (MACHADO *et al.*, 2016; NABAS, *et al.* 2009).

Levando em consideração que os criadouros descartam todo o tecido adiposo e este pode ser aplicado como subproduto reutilizável, o presente trabalho teve por objetivo realizar um estudo bibliográfico sobre o potencial farmacológico do óleo de rã-touro, realizar a extração e caracterização físico-química deste óleo visando incentivar o aproveitamento biotecnológico do principal resíduo gerado pelo abate do animal em ranários brasileiros, bem como analisar sua possível atividade antioxidante.

2 Referencial Teórico

2.1 Rã-touro

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é um anfíbio do Reino Metazoa, Filo Chordata, Classe Amphibia, Ordem Anura, Família Ranidae, Gênero Rana e Espécie *Rana catesbeiana* Shaw (**Figura 1**). Originário do nordeste dos Estados Unidos e sudeste do Canadá, atualmente este anfíbio possui predominância e variedade de espécies em regiões tropicais, inclusive no Brasil onde foi introduzida por meio da ranicultura na década de 30, adaptando-se facilmente, em um ambiente com condições climáticas propícias para a reprodução e que favorecem a aceleração do metabolismo e consequentemente a alimentação, proporcionando a obtenção de animais com massa superior às espécies nativas (FERREIRA *et al.*, 2002; SILVA, 2016; AMARAL, 2015).

Figura 1: Rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw)

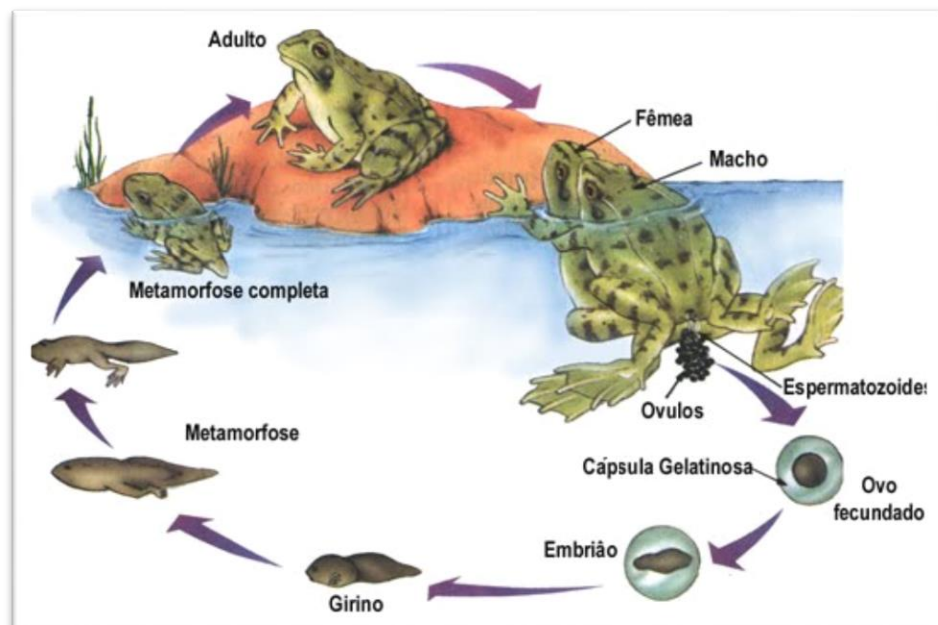


Fonte: Mural da Biologia UCS, 2010.

Existem diferentes espécies de anfíbios, os quais podem ser conhecidos popularmente por sapos, pererecas e em especial, as rãs que podem pertencer às famílias Ranidae, Pipidae ou Leptodactylidae. É característica dessa espécie a pele lisa, pernas grossas e alongadas, dorso de cor verde que pode variar para a cor marrom e ventre com tons mais claro. As rãs são conhecidas por diversos nomes como rã-pimenta, rã-touro, rã-manteiga, entre outros, variando de acordo com a região. Dentre todas as espécies nativas existentes, no Brasil, a rã-touro é a única espécie mantida em criatórios para comercialização e, é muito apreciada devido ao sabor de sua carne. (LIMA, 1999; CUNHA; DELARIVA, 2009).

A rã é considerada um animal ectodérmico devido à sua capacidade de alterar seu metabolismo de acordo com a temperatura do ambiente. Em vista disso, a rã vive alternadamente em terra e água, porém sua reprodução está restrita ao ambiente aquático e por isso preferem habitar áreas próximas a rios, lagos e riachos. Após o acasalamento a fêmea deposita seus ovos próximos às margens e à vegetação e estes ovos permanecerão na superfície da água até dar origem aos girinos. Os girinos sofrerão metamorfose transformando-se no imago e posteriormente no animal adulto, passando a viver também no ambiente terrestre (**Figura 2**) (FERREIRA; PIMENTA; NETO, 2002).

Figura 2: Ciclo reprodutivo da rã-touro



Fonte: Blog rãs e sapos, 2012.

A rã-touro adulta é um animal carnívoro e possui uma alimentação inicialmente baseada em insetos e vermes, porém com hábitos alimentares diversificados (BOELTER; CECHIN, 2007; FICETOLA, *et al.*, 2007). Devido à facilidade de adaptação e às condições climáticas propícias do país, a *Rana Catesbeiana* foi introduzida com êxito no Brasil por volta de 1930, desde então, é alvo das indústrias do setor alimentício tornando-se ótima fonte de renda devido ao alto valor econômico agregado à sua carne, alta taxa de reprodução, além da enorme possibilidade para o completo reaproveitamento de todos os resíduos provindos da criação. A carne de rã destaca-se nutricionalmente por possuir alto teor de proteínas de elevado valor biológico e reduzido teor de calorias e lipídios. Devido à sua composição e similaridade ao

sabor da carne de frango, esta carne é muito indicada para pacientes com transtornos digestivos, processos alérgicos e também para uso em dietoterapia (CRIBB *et al.*, 2009).

Esta carne possui alto teor de cálcio disponível e de fácil absorção, por isso também é indicada para pacientes com carência de cálcio, quadros de osteoporose e em casos de alergia à lactose, uma vez que a proporção e disponibilidade do cálcio na carne de rã são comparadas a do leite, suprimindo então as necessidades do organismo tanto em relação a este componente quanto como fonte de proteínas (CRIBB *et al.*, 2009).

Além de comercializar a carne das coxas, os criadores utilizam as carcaças e as patas trituradas como ração para os girinos de rã-touro, podendo comercializar também a pele para outras indústrias que as utilizam na fabricação de bolsas, sapatos e diversos outros objetos de uso convencional. Outro resíduo que também é possível reaproveitar é o tecido adiposo, que constitui cerca de 10% do peso total do animal, utilizado para extrair o óleo de rã o qual tem sido alvo de muitas pesquisas na tentativa de elucidar e comprovar seu grande potencial terapêutico, a fim de desenvolver novas formulações farmacêuticas (LOPES, 2003; LOPES, 2010).

2.2 Óleos e gorduras

Os óleos e gorduras são constituídos principalmente por triglicerídeos e se diferem apenas pelo estado físico em que se apresentam à temperatura ambiente. As gorduras animais possuem forma sólida em temperatura ambiente porque são formadas por ácidos graxos saturados (AGS) ou, em alguns casos, contém apenas uma insaturação o que confere ao composto um ponto de fusão mais elevado. Já os óleos apresentam-se na forma líquida à temperatura ambiente devido ao aumento no número de insaturações que diminui a força de interação entre as moléculas de ácidos graxos (AG) que os compõem ocasionando a diminuição do seu ponto de fusão (COUTINHO, 2002; ALI *et al.*, 2015).

Nutricionalmente, estes compostos são de suma importância para os seres humanos, pois além de serem excelente fonte de energia exercem funções biológicas, servindo também como veículo para vitaminas e substâncias lipossolúveis, bem como são normalmente utilizados em frituras para causar modificação sensorial em alimentos conferindo sabor, odor e textura mais atrativos para o consumidor (GARÓFOLO; PETRILLI, 2006).

Do ponto de vista econômico, os óleos e gorduras de origem animal são mais baratos em relação aos de fonte vegetal. Portanto, a descoberta de técnicas para obtenção de óleos a partir de gorduras de origem animal, possibilitou a utilização destes compostos tanto para o consumo humano quanto para o desenvolvimento de produtos com grande importância

terapêutica (LOPES, 2003; DANTAS *et al.*, 2010). Estes óleos naturais possuem variada composição de ácidos graxos, aminoácidos e metabólitos secundários, os quais tem sido alvo de pesquisas, sendo relacionados a uma possível atividade farmacológica (MÉNDEZ *et al.*, 1998).

2.3 Lipídios e Triacilgliceróis

Os triacilgliceróis são uma forma de armazenamento energético eficiente, sofrem menos oxidação que os carboidratos e são compostos com característica química apolar. Sua obtenção é realizada por reações de esterificação de ácidos graxos com três grupos hidroxilas de glicerol, podendo originar compostos simples com apenas um tipo de ácido graxo ou complexo, formado por misturas de AG, podendo possuir de dois a três tipos de ácidos graxos diferentes (LEHNINGER, 2002).

Os triglicerídeos são os principais constituintes de óleos e gorduras e possuem grande importância nutricional para os seres humanos, pois são metabolizados com o auxílio de enzimas específicas (lipases) e órgãos como o fígado, que os transformam em glicerina e ácidos graxos disponibilizando-os para obtenção de energia, bem como para exercerem a função de isolantes térmicos e constituir reservas energéticas, sendo então armazenados pelos adipócitos formando o tecido adiposo (LEHNINGER, 2002).

Ácidos graxos são substâncias orgânicas, em que a maioria deles são formados por cadeias alquílicas longas e alifáticas que contém um grupamento carboxílico terminal. Devido às suas características químicas, como sua estrutura hidrofóbica, os ácidos graxos possuem baixa solubilidade em solventes polares proporcionando-os funções valiosas como o isolamento e proteção de órgãos nos seres vivos, pois, juntamente com as proteínas. Além disso, os AG compõem as membranas celulares, desempenham a sinalização intra e intercelular e desenvolvem funções especializadas compondo hormônios e vitaminas. São também reservas energéticas visto que constituem alguns lipídios que, são utilizados pelas células de todos os seres vivos como uma das principais fontes de energia (PERINI *et al.*, 2010).

Quando a cadeia alquílica de um ácido graxo é composta somente por ligações simples entre os átomos, este composto pode ser classificado como um ácido graxo saturado (AGS), já quando há presença de pelo menos uma dupla ligação na cadeia deste composto, ele será denominado ácido graxo insaturado (AGI). Os AGI podem ser divididos de acordo com a quantidade de insaturações presentes em sua cadeia carbônica, sendo nomeado como ácido graxo monoinsaturado (AGMI) quando houver apenas uma dupla ligação e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) quando possuir mais de uma instauração (PERINI *et al.*, 2010).

Outra classificação que é dada aos ácidos graxos está relacionada à possibilidade de estes compostos serem ou não sintetizados pelos mamíferos, sendo então conhecidos como ácidos graxos não essenciais aqueles estão naturalmente presentes no organismo, enquanto os que não são possíveis de serem sintetizados devido à ausência de delta-9-dessaturase, uma enzima necessária para a síntese desta molécula, e necessitam ser ingeridos por serem obtidos exclusivamente por meio da dieta alimentar, são denominados ácidos graxos essenciais (AGE). Os AG saturados são mais facilmente armazenados por possuírem uma cadeia linear, já os AGI possuem uma curvatura na molécula devido à presença da instauração (PERINI *et al.*, 2010).

Os AGE's são de extrema importância para o bom funcionamento das células, pois mantêm a fluidez e integridade das membranas celulares. São imprescindíveis para a síntese de componentes e precursores de respostas inflamatórias e imunológicas, atuando de modo a acelerar o processo de cicatrização e reparação tecidual e, atenuar a resposta inflamatória. Os ácidos graxos essenciais recebem essa denominação devido à incapacidade de serem sintetizados pelo organismo humano, tornando a alimentação a principal fonte de obtenção destes nutrientes (CANO, *et al.*, 2008; MENIS *et al.*, 2012).

De acordo com pesquisas científicas realizadas, durante anos, com o intuito de comprovar e elucidar a eficácia do uso dos AGEs no tratamento de feridas cutâneas, constatou-se que a carência destes compostos no organismo humano pode acarretar diversas reações adversas e comprometer a homeostase ao alterar algumas funções celulares e impedir o bom funcionamento de órgãos e tecidos, resultando em problemas de saúde como o aparecimento de lesões de pele, baixa estatura e perda de peso, retardos na cicatrização, coagulação e funções plaquetárias, problemas renais, entre outros (MANHEZI *et al.*, 2008).

Os lipídeos são moléculas orgânicas formadas por longas cadeias carbônicas que constituem um grande grupo de compostos como os óleos, as gorduras, as ceras dentre outros. Eles possuem características apolares, ou seja, são insolúveis em água devido à sua maior afinidade por solventes orgânicos. As macromoléculas lipídicas podem ser formadas inteiramente por carbonos e hidrogênios ou podem conter grupos funcionais, os quais definirão o tipo de lipídio que será formado, como por exemplo, o conjunto de lipídios que apresentam em sua molécula grupos funcionais como ácidos carboxílicos e compõem os óleos e gorduras. (RAMALHO; SUAREZ, 2013).

Estes compostos químicos são extraídos de matéria-prima animal ou vegetal e são chamados de óleos e gorduras, os quais se diferem apenas pelo estado físico em que se apresentam à temperatura ambiente, líquido ou sólido, respectivamente. São utilizados pelos seres humanos como insumos alimentares e não alimentares, possuindo ampla aplicabilidade

nutricional, industrial, tecnológica e farmacológica e, além disso, compõem a maior parte do tecido adiposo, sendo considerados como uma importante fonte de energia para todas as células vivas (FONSECA; GUTIERREZ, 1974).

Dentre tantas características e vantagens conferidas à utilização dos lipídios tanto para a fisiologia humana quanto em processos industriais como a fabricação de alimentos e produtos com fins cosméticos e terapêuticos, existe o principal problema relacionado ao uso desses compostos que é a facilidade de sofrerem degradação, criando assim certa limitação para o uso de tal matéria-prima (FERRARI, 1998; ANTONIASSI, 2001).

2.4 O óleo de Rã-touro e seu uso terapêutico

O óleo de rã-touro é obtido a partir do tecido adiposo do anfíbio *Rana Catesbeiana* Shaw e para sua obtenção, tal tecido pode ser submetido a diferentes processos de extração como o uso de aquecimento ou a utilização de solventes orgânicos. Ele é considerado um óleo natural de baixa toxicidade, altamente biodegradável, renovável e rico em substâncias farmacologicamente ativas (MACHADO *et al.*, 2016).

De acordo com a medicina popular que é passada de gerações a gerações, a população utilizava a pele de rã-touro para o tratamento de feridas e queimaduras onde se cobriam as lesões com esse tecido de forma que a camada de gordura da pele do anfíbio ficava em contato direto a ferida que se desejava tratar. Como bem sabemos muitas descobertas importantes para terapias atuais foram baseadas em conhecimentos da medicina popular, alguns pesquisadores iniciaram as buscas por evidências científicas deste tipo de tratamento sugerindo que a pele da rã-touro possui queratina e colágeno e poderia ser utilizada como curativo para lesões cutâneas, pois haveria a formação de um filme oclusivo e aceleração da cicatrização além de conferir proteção à área lesada. No entanto, os resultados obtidos não foram muito satisfatórios já que este método não se mostrou tão eficaz como se desejava. Em vista disso, novas pesquisas foram realizadas, desta vez com enfoque no óleo de rã-touro que é extraído do tecido adiposo do animal, em busca de identificar seus constituintes. O intuito foi relacioná-lo com a possível atividade farmacológica, já que, era este o tecido que ficava em contato com as lesões e não o epitélio da rã (LIMA; CRUZ *et al.*, 1999; VELLY, 2001; LOPES, 2003).

De acordo com a literatura, o óleo de rã-touro possui provável ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antiedematogênica e suposta atividade antioxidante e cicatrizante, que ainda não foram bem elucidadas por estudos anteriores. No entanto, ele tem mostrado grande potencial farmacológico devido a sua composição, sendo este rico em ácidos graxos insaturados, principalmente os ômega e aminoácidos essenciais, como demonstra a **Tabela 1**

que reúne alguns dados já descritos sobre a composição do óleo (DE NARDI *et al.*, 2004; LOPES, 2010; MACHADO, 2015).

Existem algumas pesquisas relacionadas à área dermatológica com o intuito de desenvolver produtos cada vez mais eficientes para o tratamento de lesões de pele acelerando o processo de regeneração tecidual e que não sejam tóxicos ao organismo. De Nardi *et al.* (2004) citaram em seus trabalhos que em literaturas anteriores foi constatado a utilização de formulações compostas por ácidos graxos essenciais nos tratamentos de lesões cutâneas que apresentavam dificuldade de cicatrização, onde obteve-se resultados positivos e muito satisfatórios após aplicação em lesões cutâneas causadas por diferentes razões e patologias distintas (DE NARDI *et al.*, 2004; MACHADO, 2015).

Tabela 1: Ácidos graxos presentes no óleo extraído do tecido adiposo da rã-touro.

Ácido graxo (%)	(Mendez, Sanhueza <i>et al.</i> , 1998)	(Silva, Miyasaka <i>et al.</i> , 2004)	(Lopes, T.N.C. <i>et al.</i> , 2010)
Mirístico (14:0)	2,7	2,77	1,8
Palmítico (16:0)	18,1	11,91	18,5
Esteárico (18:0)	4,1	2,34	3,2
Oléico (18:1 n-9)	31,7	37,6	36,3
Linoléico (18:2 n-6)	12,9	23,78	25,0
Linolênico (18:3 n-3)	1,4	1,97	2,1
Palmitoleico (16:1 n-7)	8,0	17,0	9,4
Eicosapentaenóico-EPA (20:5 n-3)	1,5	0,46	-
Docosaexaenóico-DHA (22:6 n-3)	4,7	0,91	0,1
Araquidônico AA (20:4 n-6)	-	0,74	0,6

Fonte: Machado, 2015

Este insumo vem sendo amplamente pesquisado e empregado em alguns tipos de terapias no Norte do país, principalmente no tratamento de processos alérgicos e inflamatórios do sistema respiratório e também na regeneração tecidual. Isto é devido ao fato de que o óleo de rã-touro além de apresentar um grande efeito terapêutico, possui certa versatilidade quanto ao seu uso e implementação em produtos farmacológicos, podendo ser administrado oralmente como princípio ativo ou como componente de emulsões para aplicação tópica. Ambas as formas farmacêuticas são propostas para o uso como anti-inflamatório, visto que há relatos em literaturas sobre a administração por via oral do óleo *in natura* para o tratamento de doenças inflamatórias do sistema respiratório, como a asma, obtendo-se resultados promissores e eficazes. No entanto, o uso por via oral deste composto pode não ser a melhor opção, pois ele

é completamente metabolizado pelo fígado e pode causar sobrecarga e toxicidade ao órgão. Por isso, emulsões a base de óleo de rã-touro tem sido muito proposta para o tratamento de feridas cutâneas, com amplas possibilidades de formulações e bons resultados em estudos *in vivo* (LOPES *et al.*, 2010).

2.5 Reaproveitamento biotecnológico dos resíduos oriundos do abate de rã-touro

O tecido adiposo da rã-touro é uma parte não comercial do animal, já que o produto que possui valor econômico é a carne e em alguns casos o couro que também é utilizado em alguns processos industriais. O processamento da carne de rã-touro gera grande quantidade de resíduos que podem contaminar o meio ambiente se não forem tratados adequadamente. Por isso, a utilização do tecido adiposo para extração do óleo é extremamente promissora, visto que se trata de um resíduo produzido em grande quantidade, pois este compõe a maior parte do peso corporal do animal. O baixo custo agregado e a total disponibilidade do material possibilitam não só o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para o tratamento de lesões de pele e outros processos inflamatórios, como também, pode ser visto como uma alternativa interessante à redução do descarte deste subproduto (GONÇALVES; OTTA, 2008).

Considerando que o tecido adiposo deste anfíbio é composto por substâncias com grande atividade terapêutica, e que a reutilização deste resíduo possibilitaria um maior ganho econômico aos rancultores, o reaproveitamento deste resíduo aumentaria a rentabilidade e a comercialização de seus produtos. Por isso, pode-se considerar que há um grande potencial econômico, biotecnológico e científico vinculado ao uso e aos estudos mais aprofundados deste subproduto, além de propiciar um avanço científico e promover melhorias das terapias relacionadas à sua aplicabilidade farmacológica (BARROS; JARDINE, 2018).

2.6 Possibilidade de produtos a serem desenvolvidos à base de óleo de rã-touro

Considerando a fácil obtenção do óleo e sua atividade terapêutica, cosmética e nutricional, é interessante investir no desenvolvimento de novos produtos visando explorar suas qualidades como atividade anti-inflamatória, cicatrizante e alto poder hidratante e emoliente. Além disso, o óleo de rã-touro é considerado uma matéria-prima de custo relativamente baixo, não tóxico e de fácil manuseio tornando-se ainda mais atrativo e promissor (BARROS; JARDINE, 2018; MACHADO, 2015).

Atualmente no mercado já existem alguns produtos à base de óleo de rã-touro, tendo como destaques os cosméticos como xampus, condicionadores, hidratantes, óleo capilar,

emulsões e tensoativos. Apesar de poucas evidências científicas, desde 1999 o óleo de rã-touro começou a ser administrado também como medicamento oral, através de cápsulas para o tratamento de doenças do trato respiratório (GUIMARAES; CORONA, 2010; LOPES, 2010).

Com base nas diversas vantagens do óleo de rã-touro, o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica de uso tópico, como por exemplo, um creme anti-inflamatório e cicatrizante seria uma alternativa simples e eficaz para o tratamento de lesões cutâneas, visto que já existem relatos de sua efetividade no tratamento de feridas, queimaduras e cortes cirúrgicos (LOPES, 2003; BARROS; JARDINE, 2018; MACHADO, 2015).

2.7 Caracterização por Cromatografia com fase Gasosa

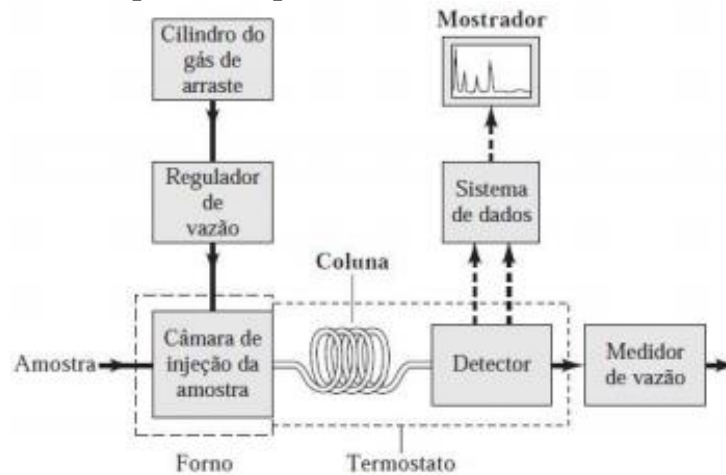
O desenvolvimento de um novo produto e o estudo de substâncias potencialmente ativas farmacologicamente depende de técnicas e equipamentos que possibilitem a análise destes compostos, a fim de, elucidar suas características químicas, físicas, estruturais e outras propriedades que, atualmente é possível de serem estudadas graças ao avanço científico e tecnológico (MORAES; DUARTE; PAULINO, 2011).

A cromatografia, de maneira geral, é uma técnica analítica muito utilizada para separação de substâncias químicas a partir de uma infinidade de materiais com natureza e complexidade variadas e, é capaz de avaliar desde amostras biológicas e químicas até amostras de produtos alimentícios. Ela é caracterizada como uma análise qualitativa com alto poder de resolução, boa sensibilidade e defectibilidade, além de possibilitar a obtenção rápida e confiável dos resultados desejados. A separação de substâncias em uma análise cromatográfica ocorre devido às interações químicas e diferença de afinidade entre os constituintes da amostra com os componentes do sistema analítico. Este sistema é constituído por uma fase fixa estacionária que preenche a coluna cromatográfica e uma fase móvel que pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico que irá percorrer toda a extensão da coluna arrastando os constituintes químicos da amostra até o detector, que por sua vez transmitirá o sinal para um equipamento eletrônico que registrará por meio de um cromatograma os picos referentes aos tempos de retenção de cada substância (SKOOG; CROUCH; PASQUINI, 2009; MORAES *et al.*, 2011).

A cromatografia a gás é uma das opções existentes de método analítico e utiliza um gás como fase móvel do sistema de separação. A análise é realizada por um equipamento sofisticado o qual é composto, de modo geral, por um circuito com dispositivos que possuem funções específicas e bem definidas, são eles: uma fonte fornecedora de gás, sistema de injeção da amostra, coluna cromatográfica que contém uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária que

pode ser sólida ou líquida, detector e registrador, como demonstrado na figura 2 que ilustra um esquema simplificado da instrumentação (SKOOG; CROUCH; PASQUINI, 2009).

Figura 3: Esquema simplificado do circuito de análise em CG.



Fonte: SKOOG; CROUCH; PASQUINI, 2009.

Para a realização da análise, a amostra é injetada e vaporizada na câmara de injeção. Em seguida entrará em contato com o gás inerte que compõe a fase móvel, o qual irá eluir arrastando a amostra sem interagir quimicamente com o analito até percorrer toda a extensão da coluna. A partir da detecção das substâncias será gerado um cromatograma de acordo com os tempos de retenção de cada componente, que estará diretamente relacionado com sua fórmula molecular e consequente volatilidade, possibilitando a comparação com padrões cromatográficos e posterior identificação (SKOOG; CROUCH; PASQUINI, 2009).

2.8 Métodos de extração e caracterização de óleos

As gorduras em geral, à temperatura ambiente de 25 °C são encontradas no estado sólido e, para que seus constituintes sejam analisados é necessário realizar a extração de seus compostos de modo que não cause a destruição destes e que seja um método viável e com boa relação custo versus tempo. Além disso, por se tratar de uma amostra sensível à degradação, torna-se necessário um cuidado a mais para que não ocorra degradação ou oxidação indesejada da amostra, comprometendo a qualidade do experimento (BRUM *et al.*, 2009).

A extração de lipídios dos alimentos é considerada um processo complicado e delicado pelo fato de que a matriz biológica possui uma constituição complexa em que há a grande possibilidade de que no procedimento ocorra interferência dos próprios constituintes desta

matriz. Por isso é de extrema importância identificar corretamente o melhor método de análise a ser utilizado (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009).

Existem diversos métodos que já foram realizados em pesquisas de naturezas distintas para extração do conteúdo lipídico de tecidos animais podendo submetê-los a tratamentos químicos e físicos como o uso de hidrólise ácida ou alcalina, porém a determinação destes compostos normalmente é feita por métodos em que se realiza a extração com solventes orgânicos. Os métodos de extração mais conhecidos foram propostos por Soxhlet e Folch e colaboradores. Franz von Soxhlet desenvolveu em 1879 um equipamento, inicialmente para extração lipídica de materiais sólidos com o uso de solvente puro (éter de petróleo, éter dietílico ou *n*-hexano), onde mantém-se a amostra em um compartimento separado do solvente que estará sob aquecimento em um sistema de refluxo o qual permite a passagem do solvente através da amostra, condensando-se em um balão na base do aparelho. Bligh e Dyer (1959) adaptaram o método de Folch e colaboradores, onde utilizaram uma mistura de clorofórmio, metanol e água empregando-a em uma extração a frio, apresentando resultados satisfatórios na extração dos compostos desejados, além de garantir um extrato qualificável para ser submetido a análises (BRUM; ARRUDA; REGITANO-D'ARCE, 2009). No entanto, é necessária uma boa avaliação sobre o método a ser escolhido, pois os lipídios são divididos em três grupos distintos estruturalmente que confere a eles propriedades químicas diferentes. Um desses grupos é denominado como lipídios neutros que se solubilizam facilmente em solventes apolares e consequentemente serão completamente extraídos do tecido adiposo se for utilizado *n*-hexano como líquido extrator. Outro grupo existente são os lipídios polares, neste caso, necessita-se de solventes orgânicos com polaridade suficiente para que seja possível extraí-los da matriz biológica onde estão associados através de interações químicas como ligações iônicas, ligações de hidrogênio, força de Van der Waals entre outras interações com as membranas celulares. Além disso, também é muito importante se atentar ao método que será utilizado para que não ocorra a degradação da amostra, já que se trata de compostos facilmente oxidáveis (BRUM *et al.*, 2009).

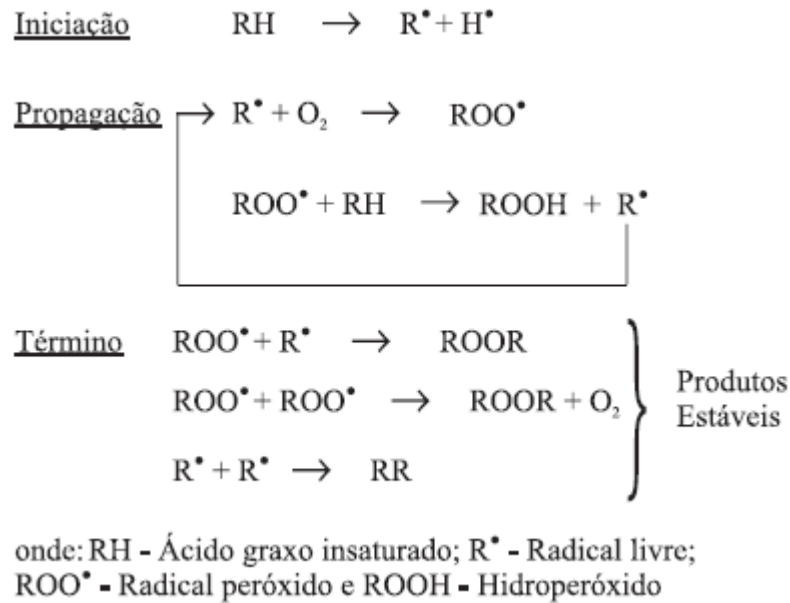
2.9 Peroxidação lipídica

Os lipídios são substâncias altamente susceptíveis à degradação promovendo a rancificação e modificação das características organolépticas do óleo. O processo de degradação é denominado como lipoperoxidação ou peroxidação lipídica que, define-se como a ocorrência de uma sequência de reações químicas desencadeadas pela ação de espécies reativas de oxigênio que agem sobre matrizes lipídicas ocasionando modificações estruturais e funcionais dos lipídios (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As reações envolvidas na lipoperoxidação podem ser agrupadas em três fases distintas denominadas como iniciação, propagação e terminação (**Figura 4**). A primeira fase, como o próprio nome já diz, refere-se ao início das reações onde há formação dos radicais lipídicos através da ação de espécies reativas de oxigênio (ERO) sobre a matriz lipídica ocasionando a remoção de um átomo de hidrogênio da molécula. Esta etapa, normalmente é catalisada por exposição a fontes energéticas ou radiação ionizante e pela presença de íons metálicos no meio reacional, principalmente o ferro (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RAMALHO; JORGE, 2005).

Então, como demonstrado a seguir, as ERO retiram um átomo de hidrogênio do ácido graxo polinsaturado formando o radical lipídico (R^{\cdot}) que reagirá rapidamente com as moléculas de oxigênio presentes no meio transformando-se em radical peroxila (ROO^{\cdot}), o qual dará continuidade às reações sequestrando novamente um átomo de hidrogênio de outra molécula de ácido graxo e formando um novo radical lipídico e assim sucessivamente até a estabilização da molécula, completa degradação de todas as moléculas constituintes do óleo e consequente término da lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; RAMALHO; JORGE, 2005).

Figura 4: Mecanismo e avaliação da peroxidação lipídica em amostras biológicas.



Fonte: Ramalho; Jorge, 2005.

2.10 Atividade antioxidante

A presença de compostos antioxidantes para impedir a formação de radicais livres tanto no meio fisiológico quanto em produtos alimentícios é de extrema necessidade para evitar ou retardar a degradação de estruturas importantes de matrizes biológicas e alimentícias (RAMALHO; JORGE, 2005).

O nosso organismo tem a capacidade de desenvolver tanto processos regenerativos quanto mecanismos de defesa contra os causadores desses danos através da produção de compostos antioxidantes que são capazes de reduzir ou neutralizar moléculas radicalares com elevada reatividade. Essa proteção pode ocorrer através da ação de enzimas específicas como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase que, são as principais enzimas responsáveis pela ação antioxidante, pois agem transformando os radicais livres altamente reativos em radicais menos reativos, isso se dá através de uma modificação estrutural dessas moléculas que caracteriza um dos tipos de mecanismo de defesa, o enzimático. Outro tipo de defesa existente contra os danos oxidativos se dá através de mecanismos não enzimáticos que ocorrem com a participação de diversas substâncias com potencial antioxidante, as quais possuem em sua composição componentes capazes de inibir ou retardar a oxidação devido à doação de átomos

ou elétrons para os radicais livres potencialmente reativos, tornando-os mais estáveis (GALVÃO *et al.*, 2008).

Embora o organismo humano possua um sincronismo de todas as funções fisiológicas com a capacidade de auto-regulação para manutenção da homeostasia, quando há produção excessiva de radicais livres, muitos danos podem ser gerados às células resultando em alterações estrutural e funcional aos componentes celulares afetados, originando distúrbios fisiológicos e patologias associadas, tornando-se necessário a presença de outros compostos antioxidantes para impedir a formação desses radicais (GALVÃO *et al.*, 2008)

Quando a concentração de radicais livres no meio celular se torna maior que a concentração de enzimas com capacidade de proteção contra a oxidação, ocorre um fenômeno conhecido como estresse oxidativo, em que há o acúmulo de radicais livres no organismo de modo que os processos fisiológicos não são suficientes para eliminá-los e reparar os danos causados, então, torna-se necessário o consumo de alimentos e a associação de formulações farmacêuticas com propriedades antioxidantes como alternativas para proteção e regeneração celular (RAMALHO; JORGE, 2005; GALVÃO *et al.*, 2008).

Os compostos com potencial antioxidantes mais conhecidos são as vitaminas A, C e E, carotenoides, licopeno, flavonoides e uma infinidade de outras substâncias que podem ser encontradas em diversos alimentos. Embora já existam muitas substâncias e alimentos com grande potencial para este tipo de benefício, ainda há pesquisas que buscam a descoberta de diferentes mecanismos ou novas substâncias capazes de promover proteção contra os efeitos deletérios dessas reações, que são tão comuns em organismos vivos e também os principais fatores da degradação de alimentos (ALVES *et al.*, 2010).

Em vista disso, tem-se realizado experimentos *in vitro* utilizando diferentes técnicas para determinação da atividade antioxidante com o intuito de descobrir e selecionar novas substâncias capazes de combater ou retardar a oxidação do meio biológico ou de alimentos, tornando-se interessantes para o uso terapêutico, na prevenção de doenças e à utilização no desenvolvimento de novos produtos. Dentre todos os métodos já pesquisados, o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico tem se destacado em análises laboratoriais por ser um procedimento relativamente simples e fácil realização por pessoas devidamente capacitadas (GALVÃO *et al.*, 2008; ALVES *et al.*, 2010; LOBO *et al.*, 2010).

2.10.1 Avaliação in vitro do potencial antioxidante

Marco (1968) desenvolveu um teste para determinação da atividade antioxidante em materiais lipofílicos utilizando o sistema aquoso-lipofílico de β -caroteno/ácido linoleico e, alguns anos depois mais precisamente em 1971, foi modificado por Miller, H.E. Este método de análise baseia-se na descoloração do β -caroteno que possui coloração alaranjada intensa, causada pela reação de oxidação, que é induzida por produtos de degradação do ácido linoleico formados no meio reacional devido à ação de radicais livres. A descoloração da solução que contém o sistema a ser analisado permitirá a obtenção de diferentes valores de absorvância ao serem submetidos à leitura espectrofotométrica (ALVES *et al.*, 2010)

As amostras são testadas em diferentes concentrações, de forma a, possibilitar a obtenção de resultados experimentais que poderão propor ou excluir a hipótese de uma potencial atividade antioxidante para a substância que se deseja analisar. Estes resultados são expressos em porcentagem de inibição da oxidação que, correlacionam a queda da absorvância da amostra com a queda da solução controle e são obtidos por meio de cálculos, utilizando equação descrita a seguir (ALMEIDA *et al.*, 2006).

$$\%AAO = \frac{(Abs_{inicial\ c} - Abs_{final\ c}) - (Abs_{inicial\ Am} - Abs_{final\ Am})}{(Abs_{inicial\ c} - Abs_{final\ c})} \times 100$$

Onde,

AbsC_{inicial} = Absorvância inicial do controle

AbsC_{final} = Absorvância final do controle

AbsAm_{inicial} = Absorvância inicial da amostra

AbsAm_{final} = Absorvância final da amostra

3 Material e Métodos

3.1 Amostra, Reagentes e Soluções

O Tecido adiposo de rã-touro, resíduo gerado após o abate do animal, foi adquirido no ranário Frigorã® Criatório e Frigorífico de rã-touro - Nova Era - MG, Brasil.

Os solventes e reagentes utilizados eram de grau analítico e foram fornecidos pelo Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora – MG, assim como os demais materiais necessários para realização dos testes.

3.2 Extração do óleo de *Rana catesbeiana* Shaw

Após o descongelamento à temperatura ambiente, o tecido adiposo foi submetido ao fracionamento mecânico em multiprocessador de alimentos doméstico (PHILCO) até obter um material pastoso de aspecto leitoso e odor característico. Em seguida, este material foi fracionado em três porções de 370 g/unidade e adicionado a cada porção 200 mL de solvente n-hexano. A mistura foi submetida à agitação *overnight* através de agitador mecânico (MQAMA 301) sem variação de velocidade. A fração líquida resultante deste procedimento foi separada por filtração em sistema a vácuo e papel de filtro. Posteriormente foi submetida à evaporação em evaporador rotatório (BUCHI R3) sem aquecimento até a completa remoção do solvente.

Figura 5: Tecido adiposo (a) e óleo de rã-touro (b).



(a)



(b)

Fonte: Lopes, 2010.

3.3 Extração e caracterização química do óleo de rã-touro por CG

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Gás HP7820A (Agilent) equipado com detector por ionização de chamas. Programa de aquisição de dados EZChrom Elite Compact (Agilent). Utilizou-se uma coluna SP2560 30 m x 0,25 mm x 0,20 μm (Supelco) com gradiente de temperatura: 100 °C, 0 min, 7 °C/min até 240 °C; injetor (split de 1/50) a 250 °C e detector a 260 °C. Hidrogênio como gás de arraste (3.0 mL/min) e volume de injeção de 1 μL . A identificação dos picos foi feita por comparação com padrões de ácidos graxos metilados Supelco37 Fame mix (Supelco cat no 47885-U).

3.2.1 Preparo de amostra: hidrólise e metilação de óleos

Dissolveu-se, em tubo criogênico de 2 mL, aproximadamente 12 mg da amostra de óleo em 100 μL de uma solução de etanol (95%)/ hidróxido de potássio 1 mol/L (5%). Após agitação em vórtex por 10 s, o óleo foi hidrolisado em um forno de micro-ondas doméstico (Panasonic Piccolo), à potência de 80 W (Potência 3), durante 5 min. Após resfriamento, adicionou-se 400 μL de ácido clorídrico a 20%, uma ponta de espátula de NaCl (~20 mg) e 600 μL de acetato de etila. Após agitação em vórtex por 10 s e repouso por 5 min, uma alíquota de 300 μL da camada orgânica foi retirada, colocada em tubos de microcentrífuga e seco por evaporação, obtendo-se assim os ácidos graxos livres. (W. W. Christie, Gas Chromatography and Lipids, 1989, Pergamon Press). Posteriormente, os ácidos graxos livres foram metilados com 100 μL de BF_3 / metanol (14%) por aquecimento durante 10 min em banho de água a 60 °C. Os ácidos graxos metilados foram extraídos com 500 μL de hexano e analisados por Cromatografia com fase Gasosa.

3.3 Teste antioxidante

3.3.1 Tratamento da água destilada

A água recém-deionizada e armazenada foi submetida à aeração através de um sistema de bomba de ar acoplado a um tubo de vidro com uma rolha inserida na extremidade que ficará submersa na água, oxigenando-a durante 30 minutos.

3.3.3 Emulsão β -caroteno/ ácido Linoleico

Na ausência de luz, foi pesado 5 mg de β -caroteno e transferido para um balão volumétrico de 5 mL. Em seguida, adicionou-se clorofórmio aos poucos até o β -caroteno se dissolver completamente completando o volume do balão com clorofórmio e homogeneizando-o, obtendo-se uma solução límpida.

Em um balão de fundo chato (protegido da luz com papel alumínio) adicionou-se 50 mg de ácido linoleico, acrescentou-se 200 mg de Tween 40 e 1 mL da solução de β -caroteno preparada anteriormente. A mistura foi submetida ao evaporador rotatório (BUCHI R3) até a completa evaporação do solvente. O resíduo foi redissolvido com adição lenta de água oxigenada deionizada até completar o volume total de 50 mL de água acrescentada. Durante todo o procedimento o balão foi submetido ao ultrassom com banho de gelo, com o intuito de não permitir o aquecimento do líquido, até obter uma emulsão límpida com absorvância entre 0,6 e 0,7 a 470 nm.

3.3.4 Preparo das soluções de óleo de rã-touro

Foi pesado exatamente 22,0 mg de amostra em um microtubo tipo *eppendorf* e acrescentado etanol em quantidade suficiente para solubilizar, homogeneizando-o por agitação em vórtex. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 20 mL e completou-se o volume com etanol, originando uma solução mãe na concentração de 1100 $\mu\text{g/mL}$. A partir desta solução-mãe, retiraram-se alíquotas de 2,0 mL e 4,0 mL transferindo-as para balões volumétricos distintos com capacidade de 10 mL e avolumando-os com etanol, originando as soluções amostras concentração com concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ e 40 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

3.3.5 Preparo da solução controle

Foram transferidos 0,5 mL (500 μL) de etanol para os tubos Falcon previamente identificados e protegidos com papel alumínio. Em seguida foi adicionado a este mesmo tubo

uma alíquota de 5 mL da emulsão de β -caroteno, homegeneizando-o. O procedimento foi repetido obtendo-se um tubo controle para cada replicata.

3.3.6 Preparo da emulsão controle e dos brancos

Foi adicionado 50 mg de ácido linoleico em um balão de fundo chato (protegido da luz com papel alumínio), em seguida acrescentou-se 200 mg de Tween 40. Com o balão em banho de gelo no ultrassom, adicionou-se aos poucos 50 mL de água oxigenada deionizada, mantendo a agitação até a obtenção de uma emulsão límpida.

▪ *Solução referente ao Branco das amostras*

Foi retirada uma alíquota de 5 mL desta emulsão e adicionada aos tubos contendo 0,5 mL (500 μ L) de amostra. Este procedimento foi realizado para cada concentração de amostra a ser analisada.

▪ *Solução referente ao Branco do controle*

Aliquotou-se 5 mL da emulsão preparada anteriormente e 0,5 mL (500 μ L) de etanol, transferiu-se para um tubo falcon previamente identificado.

3.4 Determinação da atividade antioxidante

Primeiramente, foi feita a calibração do espectrofotômetro utilizando água deionizada. A partir da emulsão de β c-ác.linoleico previamente preparada, foi retirada uma alíquota de 5 mL e transferida para o tubo controle contendo 0,5 mL de EtOH. A mistura foi submetida à agitação em vórtex, transferida para uma cubeta de vidro e levada ao espectrofotômetro a 470 nm, obtendo-se a leitura imediata da absorvância inicial (t_0) do controle, repetindo o mesmo processo para o tubo contendo a solução referente ao branco do controle. Após a leitura os tubos foram incubados em bloco térmico (BT-02) a 50 °C.

O mesmo procedimento foi repetido, para todas as concentrações de amostras a serem analisadas, partindo da menor para a maior concentração, e seus respectivos brancos, fornecendo a medida da absorvância inicial (t_0) de cada uma delas. As leituras foram repetidas a cada 15 min e retornando ao banho térmico até completar o tempo total de 120 min.

4 Resultados e Discussão

Na **Tabela 2** a seguir, estão descritas as porcentagens de ácidos graxos presentes na amostra de óleo que foi extraído a partir do tecido adiposo de rã-touro e analisado por cromatografia gasosa. Como observado, o óleo é composto por 21 ácidos graxos identificáveis e uma pequena porcentagem de compostos os quais não foi possível obter a identificação exata por extrapolar os constituintes do padrão utilizado para a comparação. Os principais constituintes deste óleo são os ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2), palmítico (C16:0) e palmitoleico (C16:1). No entanto, outros AG's que também compõem o material analisado, em menor concentração, porém ainda em quantidade significativa, são: o mirístico (C14:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), linolênico (C18:3), eicosanóico (C20:1) e docosaenoico (C22:6).

Tabela 2: Perfil de ácidos graxos presentes no óleo de rã-touro.

Pico	Ácido Graxo	RT (min)	Pico (área)	Concentração (%)
1	C14:0	6.11	233636	1.3
2	C14:1	6.80	57273	0.3
3	C15:0	7.04	32580	0.2
4	C16:0	8.01	3197606	18.4
5	C16:1	8.55	2145888	2.4
6	C17:0	8.84	93320	0.5
7	C17:1	9.39	41962	0.2
8	C18:0	9.80	483977	2.8
9	C18:1	10.30	6608534	38.1
10	C18:2	11.03	3617359	20.9
11	C20:0	11.24	113463	0.7
12	C18:3	11.53	34383	0.2
13	C20:1	11.86	233858	1.3
14	C18:3	11.91	52909	0.3
15	C21:0	12.04	27656	0.2
16	C20:2	12.63	30498	0.2
17	C22:0	13.13	35877	0.2
18	C20:3	13.50	111607	0.6
19	C22:2	14.35	20677	0.1
20	C24:1	15.08	19122	0.1
21	C22:6	16.21	49435	0.3
	Outros		101070	0.6

Fonte: Resultado da pesquisa

Apesar de não possuir resultados conclusivos sobre o seu potencial anti-inflamatório devido à falta de estudos mais aprofundados, os AG além de serem essenciais para a nutrição humana e para a manutenção de vários processos fisiológicos, são importantes também para manter a integridade de muitas estruturas do nosso organismo e o equilíbrio lipídico de tecidos como a pele. Os ácidos graxos ômega 3 (ácido linolênico) e ômega 6 (ácido oleico) foram considerados por Manhezi e colaboradores (2008) como compostos de extrema importância ao desempenhar funções como a manutenção da elasticidade e integridade da pele. Eles são componentes da camada epidérmica conhecida como estrato córneo, que atua como uma barreira de proteção dos tecidos mais internos e mantem a hidratação da pele ao impedir a perda de água transepidermal. Posteriormente, Machado e colaboradores também apresentaram estudos que indicam além da atividade anti-inflamatória, a probabilidade de que os AGE's também podem exercer funções antitumorais. Aliado a isto, os dados obtidos através da caracterização química do perfil de ácidos graxos contidos no óleo de rã-touro analisado, demonstrou concentrações elevadas de ácidos graxos essenciais. Isto sugere que, o óleo de rã-touro realmente possui potencial anti-inflamatório, tendo como embasamento teórico as pesquisas realizadas pelos autores citados, elucidando que os AGE's são os principais responsáveis pela atividade farmacológica do óleo (MANHEZI; BACHION; PEREIRA, 2008, MACHADO, 2016).

Em estudos recentes, Davim (2017) também relatam o potencial anti-inflamatório dos ácidos graxos poli-insaturados e afirmam que este é relacionado principalmente à sua capacidade em atuar na redução da atividade de fatores mediadores da inflamação, como o fator nuclear Kappa B (NF-kB). Ao reduzir a produção de NF-kB, conseqüentemente haverá diminuição da liberação e da ação de citocinas, que estão diretamente envolvidas com o processo inflamatório e a lesão tecidual havendo então modulação da resposta imunológica. Ademais a isso, os AG são capazes de promover a aceleração do processo cicatricial de feridas e lesões celulares devido à sua capacidade de promover angiogênese, quimiotaxia, mitose e aumento da permeabilidade celular, facilitando assim o recrutamento de células do sistema imune e dos fatores de crescimento para promover a regeneração tecidual, tornando-se então substâncias promissoras e muito efetivas na regulação de distúrbios imunológicos e tratamento de feridas cutâneas (DAVIM, 2017).

Como pode ser observado na **Tabela 3**, o óleo de rã-touro pode ter composição e concentração de ácidos graxos variáveis de acordo com a fonte literária utilizada. Esta variação é muito comum, pois o tecido adiposo é caracterizado como a principal reserva energética de um ser vivo e, é sabido que os ácidos graxos, principalmente os essenciais, são originários da

dieta devido à incapacidade de síntese pelos animais vertebrados. Então, devido às variações do habitat natural em que este anfíbio vive e da dieta a que está submetido, poderão ocorrer variações significativas na concentração destes compostos quando se avalia dados de pesquisas científicas de diferentes autores, cujo material analisado possui procedência diversa (COUTINHO, 2002).

Tabela 3: Variações de dados literários sobre a composição do tecido adiposo de rã-touro.

Ácido graxo (%)	(Mendez, Sanhueza <i>et al.</i> ,1998)	(Silva, Miyasaka <i>et al.</i> , 2004)	(Lopes, <i>et al.</i> ,2010)	Experimento (2017)
Mirístico (14:0)	2,7	2,77	1,8	1,3
Palmítico (16:0)	18,1	11,91	18,5	18,4
Esteárico (18:0)	4,1	2,34	3,2	2,8
Oléico (18:1 n-9)	31,7	37,6	36,3	38,1
Linoléico (18:2 n-6)	12,9	23,78	25,0	20,9
Linolênico (18:3 n-3)	1,4	1,97	2,1	0,2
Palmitoleico (16:1 n-7)	8,0	17,0	9,4	2,4
Eicosapentaenóico-EPA (20:5 n-3)	1,5	0,46	-	-
Docosaexaenóico-DHA (22:6 n-3)	4,7	0,91	0,1	0,3
Araquidônico-AA (20:4 n-6)	-	0,74	0,6	-

Fonte: Criado pela autora com dados extraídos de Machado, 2015.

Assim sendo, seria interessante submeter o animal a uma alimentação enriquecida e direcionada ao aumento da concentração dos principais ácidos graxos responsáveis pelo efeito terapêutico do óleo, tendo por objetivo a produção de formulações inovadoras e muito promissoras devido à sua importância metabólica, ação anti-inflamatória e cicatrizante como citado anteriormente. Estas formulações poderão possuir características multifuncionais, pois além de acelerar o processo de recuperação, agregam também outros benefícios como, por exemplo, a hidratação da pele, em caso de formulações tópicas, devido ao alto poder emoliente dos compostos lipídicos ou provendo o melhoramento funcional e cognitivo com ação exclusiva dos AGEs, quando submetidos a formulações de uso interno.

No presente trabalho, foram realizados experimentos com o óleo de rã-touro a fim de determinar o seu potencial antioxidante frente às reações de peroxidação lipídica que comumente ocorrem no meio biológico. O estudo foi efetuado por meio de testes *in vitro* utilizando o sistema aquoso-lipofílico de β -caroteno/ácido linoleico, o qual possui a capacidade

de mimetizar as reações de peroxidação que ocorrem *in vivo*, sendo este um fator determinante para a escolha do método neste experimento e também por ser considerado o mais apropriado devido à natureza lipídica da amostra. Aliado a isso, definiu-se a aplicação do teste com o sistema de β -caroteno/ácido linoleico após a falta de atividade obtida em uma tentativa anterior de análise por meio do método de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Neste teste, apesar de as análises terem sido realizadas em concentrações máximas de amostra não foi possível obter indícios de atividade do óleo, tendo como argumento o fato de se tratar de um método de análise por transferência de elétrons o qual foi empregado para avaliação de uma amostra lipídica que é composta principalmente por ácidos graxos. É sabido que, os ácidos graxos não são passíveis de realizar este tipo de reação química, portanto o método DPPH não seria o mais adequado neste caso.

Na **Tabela 4**, estão descritos os dados experimentais do teste de escolha (β -caroteno/ácido) realizado em duplicatas. Estes dados referem-se aos resultados obtidos a partir dos cálculos efetuados através da equação descrita anteriormente para a obtenção do percentual de inibição da amostra, onde são correlacionadas as quedas das absorvâncias da amostra com as do controle. A partir da obtenção do percentual de inibição de cada réplica, calculou-se a média aritmética entre elas e o consequente desvio padrão e desvio padrão relativo, cujos valores encontrados também estão expressos na tabela a seguir.

Tabela 4: Resultados das análises antioxidantes em porcentagem de inibição das amostras do óleo de rã-touro (média \pm DP; n=2).

DADOS EXPERIMENTAIS		
% Inibição	Concentração ($\mu\text{g/ml}$)	
	40	100
Réplica A	23,75	21,50
Réplica B	23,31	23,54
DADOS ESTATÍSTICOS		
Médias	23,53	22,52
DP (Desvio Padrão)	0,31	1,44
DPR % (Desvio Padrão Relativo)	1,32	6,41

Fonte: Resultados da pesquisa

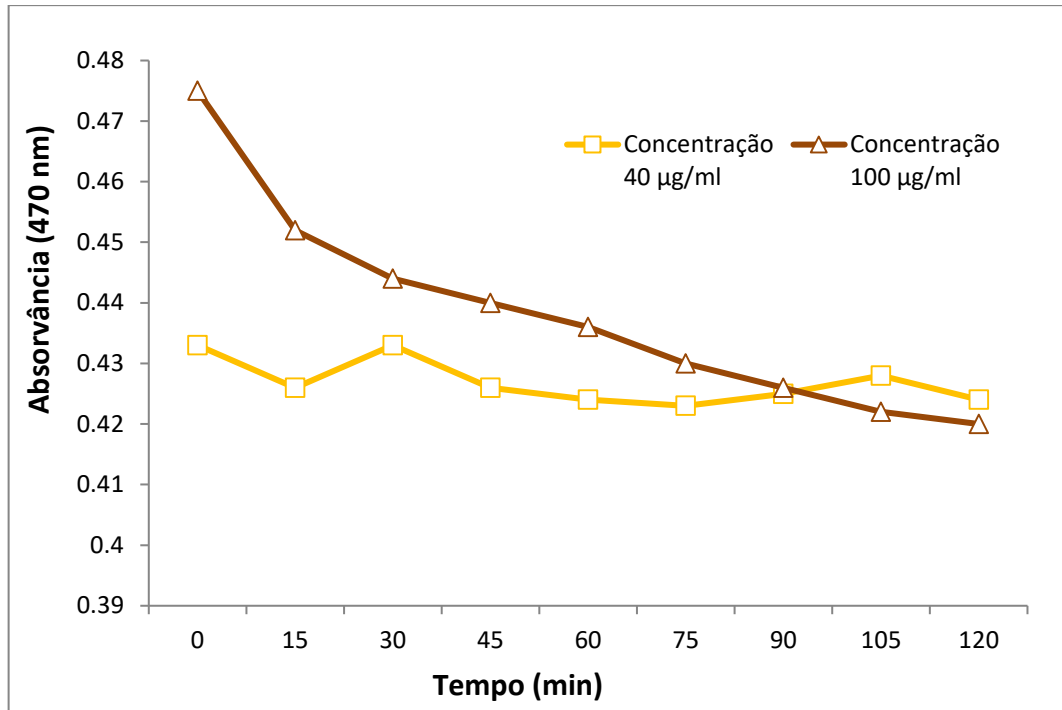
De acordo com os dados apresentados (**Tabela 4**), nota-se que não houve variações significativas no comportamento cinético de inibição entre as réplicas A e B em ambas as concentrações, visto isso, não é possível afirmar ao certo, porém, essa proximidade dos resultados, mesmo as amostras possuindo concentrações tão discrepantes, pode ser justificada através da possibilidade de que, nas concentrações em que o óleo foi testado tenha sido

alcançado um platô em que supostamente houve o máximo de inibição possível da reação de peroxidação lipídica fornecido pela amostra, indicando que talvez o aumento da concentração não apresente variações relevantes quanto a esse percentual.

Em relação ao Desvio Padrão (DP) e Desvio Padrão Relativo (DPR) obtido para as análises de ambas as réplicas, notou-se que os resultados foram relativamente satisfatórios, onde não ocorreu grande dispersão entre os valores experimentais em relação à média, caracterizando boa precisão da análise. No entanto, estes dados ainda não são conclusivos devido às condições em que o teste foi realizado, onde, o método ainda não estava devidamente validado e foi utilizado um número de amostras insuficientes para a obtenção de resultados estatísticos confiáveis. Em vista disso, não é possível concluir esta tese por enquanto, pois é estritamente necessária a repetição dos testes, desta vez, com número de amostras adequado e variação das concentrações de óleo que sejam suficientes para fornecer um perfil reacional do processo de inibição da peroxidação lipídica. Também é de extrema importância a utilização de métodos devidamente validados e parametrizados, atentando-se para a eliminação do máximo de interferências possíveis, tanto instrumentais quanto analíticas, visto que se trata de um método cinético complexo.

A **Figura 6** correlaciona os valores médios das absorvâncias obtidas para as réplicas A e B obtidas através das leituras espectrofotométricas de cada duplicata em ambas as concentrações testadas (40 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$) em função do tempo de reação.

Figura 6: Curva da determinação da atividade antioxidante para as diferentes concentrações de amostras do óleo de rã-touro utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico.



Fonte: Elaborado pela autora

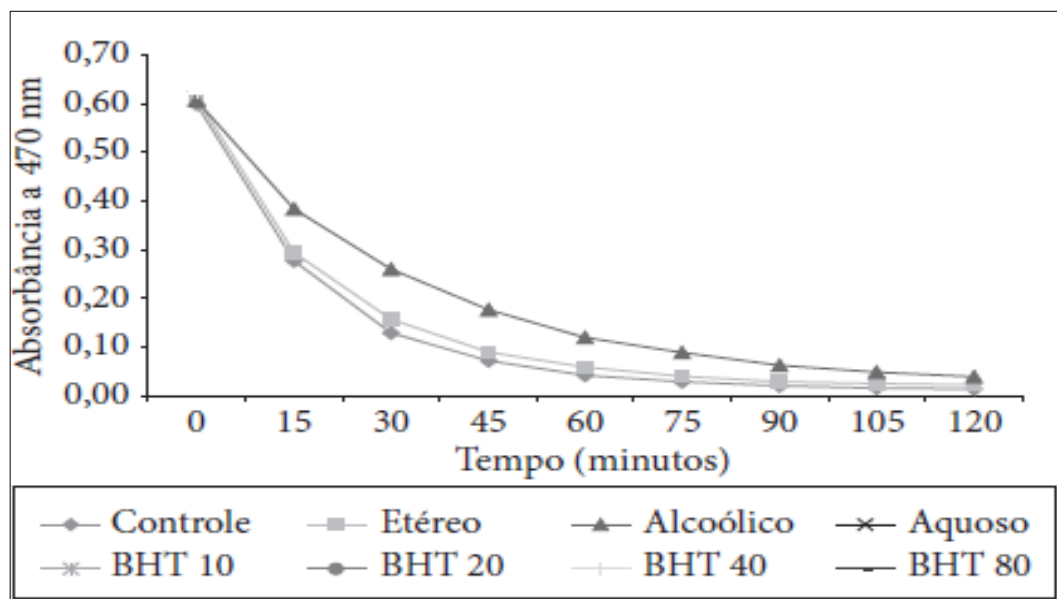
O método empregado para determinação da atividade antioxidante do óleo de rã-touro não tem a função de relacionar a concentração da amostra com a atividade antioxidante exercida por ela, ou seja, ele não é utilizado com o intuito de determinar a concentração eficaz de óleo capaz de exercer tal atividade. Sendo assim, este teste é considerado como um método analítico qualitativo, onde, as diferentes concentrações que foram estabelecidas no ensaio realizado são para abranger e estabelecer uma concentração adequada que facilite a realização do teste e a obtenção de resultados coesos que garantam a reprodutibilidade e robustez do método.

A determinação do decaimento da absorvância (470 nm) com o tempo de reação nos permitiu investigar em qual parte da cadeia de reações da peroxidação lipídica (iniciação, propagação ou terminação) o óleo de rã-touro poderia atuar. De acordo com a **Figura 6**, a atuação do óleo de rã-touro foi mais eficiente na etapa de propagação da reação de peroxidação, onde ocorre a formação de peróxidos, obtendo pouca variação no decaimento da absorvância nos demais tempos de leitura. Ademais a isso, deve-se considerar também a possibilidade de ocorrer a peroxidação da própria amostra devido à sua composição que, onde os componentes presentes em maior quantidade como visto anteriormente, são os ácidos graxos insaturados, os quais possuem maior sensibilidade à degradação. A partir disso, pode-se perceber então que,

mesmo possuindo composição que facilita a degradação e que seria ainda mais acentuada quando submetida à exposição prolongada a temperaturas mais elevadas.

Galvão e colaboradores (2006) realizou um estudo comparativo empregando o mesmo método utilizado no presente trabalho para avaliação do potencial antioxidante do óleo de linhaça comparando-o ao padrão hidroxitolueno de butila (BHT) e os dados foram expressos na **Figura 7**.

Figura 7: Atividade antioxidante dos extratos de linhaça marrom em volumes de 100 μ L.



Fonte: Galvão et al., 2008.

Como observado (**Figura 7**), os diferentes extratos do óleo de linhaça obtiveram decaimento bem acentuado da curva de absorvância bem acentuado ao longo do tempo quando comparado à curva obtida para o óleo de rã-touro. Na **Figura 6** observa-se que o óleo de rã-touro obteve boa estabilidade, mantendo-se íntegro e promovendo certa proteção ao beta-caroteno do sistema antioxidante, visto que, nas leituras das absorvâncias de 30 min a 120 min não houve decaimento acentuado da curva referente à concentração de 40 μ g/mL.

A caracterização química realizada para as amostras de óleo de rã-touro deste estudo baseou-se apenas na identificação de compostos graxos da amostra, no entanto, há a possibilidade de estarem presentes outros componentes que possam acentuar certas atividades farmacológicas do óleo e que talvez estejam relacionadas à resistência observada à peroxidação, sendo interessante a realização de uma posterior caracterização química destes outros componentes para novas investigações. Desta forma, é inevitável não falar sobre o grande valor

relacionado à esta matéria-prima que, tem se mostrado cada vez mais valiosa, visto que é totalmente reaproveitada a partir do processo de abate da *Rana catesbeiana* Shaw evitando assim o descarte desnecessário do tecido adiposo que possui uma infinidade de aplicações.

O experimento, a princípio, foi realizado em duplicata e, embora as avaliações dos resultados deste trabalho estejam fundamentadas em um número muito pequeno de amostras (n=2), optou-se em expressar os resultados obtidos, até então, como um indicativo para futuras tentativas devido à grande complexidade do experimento realizado e à necessidade de um maior número de amostras e repetições.

O principal motivo que explica os resultados com um desvio um pouco maior do que o esperado está relacionado ao uso de um número reduzido de amostras e concentrações analisadas, não sendo suficiente para abranger todos os possíveis pontos reacionais efetivos da atividade antioxidante do óleo. Um outro ponto a ser avaliado que também, que possa influenciar na obtenção de melhores resultados quanto ao potencial de inibição do óleo de rã-touro, é a utilização de outro método de extração do óleo, pois de acordo com estudos apresentados por Cooper (2001) e Brum e colaboradores (2009) a extração de lipídeos de tecido animal é complicada por ser considerada uma matriz complexa, onde seus constituintes possuem estruturas, tipo de interações e propriedades químicas distintas como, por exemplo, a variação de polaridade que, neste caso, pode ter tido influência direta na análise da amostra, pois como o tecido adiposo é composto por grupos de lipídios que podem ser caracterizados como neutros e outros com variações significativas na polaridade. Por isso, talvez a extração com uma mistura de solventes que proporcione um gradiente de polaridade seja mais interessante e capaz de extrair ambas as classes lipídicas do tecido adiposo.

5 Conclusão

A partir do estudo realizado neste trabalho e tendo em vista o indicativo de atividade antioxidante demonstrada pelos resultados obtidos nos testes aqui efetuados, pode-se dizer que, o óleo de rã-touro possui um enorme potencial terapêutico devido à sua composição rica em ácidos graxos mono e poli-insaturados, os quais promove a ele boa atividade farmacológica, como já discutido anteriormente e citado em estudos literários de alguns autores como Amaral (2015) e Lopes (2010). Portanto, afirma-se que, esta matéria-prima possui um importante valor agregado não só em termos econômicos, mas também socioambiental, uma vez que o tecido adiposo do qual é extraído este óleo é completamente descartado sem nenhum tipo de tratamento ou destino apropriado, tornando-se fruto de um desperdício biotecnológico e contribuindo para a geração de impactos negativos ao meio ambiente.

Então, em virtude das grandes funcionalidades, baixa toxicidade e alta biodegradabilidade do óleo de rã-touro, constata-se que, o reaproveitamento do resíduo lipídico gerado por criatórios do anfíbio *Rana catesbeiana* possibilita a concepção de muitas perspectivas futuras viabilizando seu uso com inúmeras finalidades, mas principalmente para o desenvolvimento de novas formulações cosméticas, farmacêuticas e nutracêuticas.

REFERÊNCIAS

ALI, M. E.; NAQUIAH, A. N. N.; MUSTAFA, S.; HAMID, S. B. A. Differentiation of frogs fat from vegetable and marine oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and chemometric analysis. Croat. **Journal Food Science Technology**, Croatia, v.1, n. 8, jun. 2015.

AMARAL, Lucas Machado. **Desenvolvimento biotecnológico de uma emulsão de uso tópico a base de óleo de rã-touro (*Rana catesbeiana* Shaw)**. 2005. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2005.

AMBIENTE, Ministério do Meio. **Gestão de Resíduos: Política Nacional de Resíduos Sólidos**. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/responsabilidade-socioambiental/a3p/eixos-tematicos/gestao-adequada-dos-residuos#footer>>. Acesso em: 02 abr. 2018.

ANTONIASSI, Rosemar. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 19, n. 2, p.353-380, jul./dez. 2001.

ALMEIDA, Joaquim Maurício Duarte et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema bcaroteno/ ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph. **Ciência e Tec. de Alim.**, Campinas, v. 26, n. 2, p.446-452, abr./jun. 2006.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, Salvador, v. 33, n. 10, p.2202-2210, out. 2010.

BARROS, Talita Delgrossi; JARDINE, José Gilberto. **Gordura animal**. Disponível em:<<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fj1om7kf02wyiv802hvm3jholyoom.html>>. Acesso em: 10 abr. 2018.

BELDA, M. C. R.; POURCHET-CAMPOS, M. A. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 11, n. 1, p. 5-35, 1991.

BIANCH, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Gregg. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 12, n. 2, p.123-130, maio/ago. 1999.

BLOG RÃS E SAPOS. **Vida na Água e na terra, 2012**. Disponível em: <<http://rasesaposblogsap.blogspot.com/>>. Acesso em: 20 jun. 2018.

BOELTER, R. A.; CECHIN, S. Z. Impact of the bullfrog diet (*Lithobates catesbeianus* - Anura, Ranidae) on native fauna: cause study from the region of Agudo RS Brazil. **Nat & Conserv**, v. 5, n. 1, p. 115-23, 2007.

BORGES, Leonardo Luiz et al. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais**. 12. ed. Goiânia: Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, 2011.

BROWN, J. R. The metabolism of amphibia. In: PRESS, N. Y. A. (Ed.). **Physiology of the Amphibia**. San Francisco and London, v.1, 1964. p.654.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, A. B. Método de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

CANO, M.A.; BACHION, M.M; LIMA, P.A. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Rev. Brasil. de Enferm.**, v.61, n.5, 2008, p. 620-628. Associação Brasileira de Enfermagem.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf**, v. 5, n. 4, p. 169-186, Oct 2006. ISSN 1541-4337.

CRIBB, A.Y.; CARVALHO, L.T.; MENDONÇA, R.C.S. **Embrapa Agroindústria de Alimentos: O consumo de carne de rã: caracterização, tendências e perspectivas.** Documentos ISSN 1516-8247, 18 p., 2009.

COUTINHO, César de Moraes. **Teor de lipídeos e composição em ácidos graxos da gordura da rã-touro (*Rana catesbeiana*, Shaw, 1802).** 2002. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Pró-reitoria de Pós-graduação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.

CUNHA, E. R.; DELARIVA, R. L. Introdução da rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW 1802): Uma revisão. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.** v. 4, n. 2, p. 34-36, jul./dez. 2009.

DAVID, Clayton Q. Alves e Jorge M. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, Salvador, v. 33, n. 10, p.2202-2210, out. 2010.

DAVIM, André Luiz Silva. **Avaliação do potencial anti-inflamatório do óleo de rã-touro puro e microemulsionado em modelo experimental.** 2017. 114 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017.

DEGÁSPARI, Cláudia Helena; WASZCZYNSKYJ, Nina. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p.33-40, jan./jun. 2004.

DE NARDI, A.B.; RODASKI, R.S.; BAUDI, D.L.K.; CASTRO, J.H.T. Cicatrização secundária em feridas dermoepidérmicas tratadas com ácidos graxos essenciais, vitaminas A e E, lecitina de soja e iodo polivinilpirrolidona em cães. **Archives of Veterinary Science.** v. 9, n.1, p. 1-16, 2004.

FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Rev. Nutr**, Campinas, v. 11, n. 1, p.3-14, jan./jun. 1998.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, Botucatu, v. 43, n. 1, p.61-68, jun. 1997.

FERREIRA, C. M.; PIMENTA, A. G. C.; NETO, S. P. Introdução à Ranicultura. Boletim Técnico do Instituto de Pesca, São Paulo, v. 33, 15 p., 2002.

FICETOLA, G. F. et al. Pattern distribution of the American bullfrog *Rana catesbeiana* in Europe. *Biol Invasions*, v. 9, n. 7, p. 767-72, 2007.

FITZPATRICK, L. C. Life-history patterns of storage and utilization of lipids for energy amphibians. *Am Zool*, v. 16, n. 4, p. 725-32, 1976.

FONSECA, H.; GUTIERREZ, L. E. **Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais**. Anais da E. S. A. Luiz Queiroz. v.31, 1974.

FOLCH, J., LEES, M., & STANLEY, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

GALVÃO, E. L.; SILVA, D. C. F.; SILVA, J. O.; MOREIRA, A. V. B.; SOUSA, E. M. B. D. Avaliação do potencial antioxidante e extração subcrítica do óleo de linhaça. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 3, n. 28, p.551-557, jul./set. 2008.

GARÓFOLO, Adriana; PETRILLI, Antônio Sérgio. Balanço entre ácidos graxos ômega-3 e 6 na resposta inflamatória em pacientes com câncer e caquexia. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 5, n. 19, p.611-621, 2006.

GONÇALVES, A. A.; OTTA, M. C. M. Aproveitamento da carne e da carcaça de Rã-Touro Gigante do desenvolvimento de hamburger. *Rev. Brasil. Eng. Pesca*, v. 3, n. 2, p. 7-15, 2008.

GUIMARAES, Benedito; CORONA, Carmen. **POLYOMEGAS: Azeite de Rana Catesbeiana**. 2010. Disponível em: <<http://polyomegasamarana.blogspot.com/>>. Acesso em: 15 jul. 2017.

GUSSO, Ana Paula et al. Comparação de diferentes métodos analíticos para quantificação de lipídios em creme de ricota. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"*, Rio Grande do Sul, v. 67, n. 389, p.51-55, nov/dez. 2012.

JORGE, S. A.; DANTAS, S. R. P. E. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. Atheneu Editora, 2003. ISBN 9788573795752.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges: ScienceDirect. *Sciencedirect: Progress. in Lipid. Research*. Montpellier, p. 244-282. maio 2007.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. Ribeirão Preto: Sarvier, 2002.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismo e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Brasil. de Ciênc. Farm.* v 37 n 03. 2001.

LIMA, S. L.; CRUZ, T. A.; MOURA, O. M. **Ranicultura: análise da cadeia produtiva**. Folha, 1999.

LOPES, L. R. et al. NADPH-Oxidase activity and lipid peroxidation in neutrophils from rats fed fat-rich diets. *Cell. Biochem. Funct.*, v. 17, n. 1, p. 57-64, Mar 1999. ISSN 0263-6484.

LOPES, V. S. **Óleo de rã-touro: um estudo físico-químico com aplicabilidade farmacologia**. 2003. Dissertação (Master). Chemical Department, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal.

LOPES, V. S. et al. Obtenção de um Tensoativo Aniônico a Partir de Óleo de *Rana catesbeiana Shaw*. **Rev. Ser. Cienc. Vida**, v. 30, n. 2, p. 85-97, 2010.

MACHADO, Lucas Amaral. **Desenvolvimento biotecnológico de uma emulsão de uso tópico a base de óleo de rã-touro (Rana catesbeiana Shaw)**. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Pró-reitoria de Pós-graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

MACHADO, Lucas Amaral et al. New Trends on Antineoplastic Therapy Research: Bullfrog (*Rana catesbeiana Shaw*) Oil Nanostructured Systems. **Molecules**. Rio Grande do Norte, p. 2-16. abr. 2016.

MANHEZI, A. C.; BACHION, M. M.; PEREIRA, A. L. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 61, n. 5, p. 620-629, 2008.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **J. Am. Oil Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MENDEZ, E. et al. Fatty acid composition, extraction, fractionation, and stabilization of bullfrog (*Rana catesbeiana*) oil. **J Am Oil Chem Soc**, v. 75, n. 1, p. 67-71, Jan 1998. ISSN 0003-021X.

MENIS, F.A.; MACHADO, V.S.B.; RIGOTTI, M.A.; ROLAN, D.L.M. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Rev. da Escola de Enfermagem da USP**, v.46, n.3, 2012, p.752-760. São Paulo.

MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidant. **J. Am. Oil Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. e Nutr.**, v. 24, p. 105-123, 2002.

MORAES, J.E.; DUARTE, K.M.R.; PAULINO, V.T. Cromatografia gasosa na determinação de ácidos graxos voláteis de materiais ensilados. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 29, Ed. 176, Art.1186, 2011.

MOREIRA, N. X.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.**, v. 24, p. 105-123, 2002.

MORETTO, E. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Varela, 1998. ISBN 9788585519414.

MURAL DA BIOLOGIA UCS. **Workshop: A Rã-touro em Caxias do Sul: Conhecendo e manejando**, 2010. Disponível em: < <http://biologiaucs.blogspot.com/2010/10/workshop-ra-touro-em-caxias-do-sul.html>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

PERINI, João Ângelo de Lima et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Rev. de Nutr.**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.1075-1086, dez. 2010.

QUERINO, Luana Andrade Lima; PEREIRA, Jógerson Pinto Gomes. Geração de resíduos sólidos: a percepção da população de São Sebastião de Lagoa de Roça, Paraíba. **Ver Monograf Ambient – REMOA**, Santa Maria, v. 15, n. 1, p.404-415, jan./abr. 2006. Universidade Federal de Santa Maria. <http://dx.doi.org/10.5902/22361308>.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. The Chemistry of Oils and Fats and their Extraction and Refining Processes. **Rev. Virt. de Quím.**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.2-15, 2013. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 475-760, 2006.

RANCIDEZ OXIDATIVA: os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. Os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. **Food Ingr. Brasil.**, v. 29, p.42-49, 2014.

RUFINO, Maria do Socorro Moura et al. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico**. Fortaleza: Embrapa, 2006.

SILVA, Francisco A. M.; BORGES, M. Fernanda M. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quím. Nova**, Paredes, v. 1, n. 22, p.94-103, abr. 1999.

SILVA, L. P. et al. Effect of bullfrog (*Rana catesbeiana*) oil administered by gavage on the fatty acid composition and oxidative stress of mouse liver. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 10, p. 1491-1496, Oct 2004. ISSN 0100-879X.

SIMIONATO, Julliana Izabelle et al. Validação da determinação de ácidos gr. In: 32ª reunião anual da sociedade brasileira de química, 2009, Fortaleza. **Soc. Brasil. de Quím. (SBQ)**, 2009.

SINKO, P. J. **Martin: físico-farmácia e ciências farmacêuticas**. Artmed, 2008. ISBN 9788536313290.

SKOOG, D.A., CROUCH, S.R., PASQUINI, C. **Princípios de Química Analítica**. Thomson, 6ª ed., 2009.

SOUZA, Nilson Evelazio de; MATSUSHITA, Makoto; VISENTAINER, Jesui Vergilio. Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. Maringá. **Arq. Apadec**. p. 102-107, 1998.

STORER, T. I.; STEBBINS, R. C. **Zoologia geral**. Companhia Editora Nacional, 1998. ISBN 9788504003550.

VELLY, M. D. L. M. A pele animal e os comportamentos mercadológicos para o novo milênio. **Boletim Técnico Instituto de Pesca**, v. 1, n. 31, p. 26-28, 2001.

VIEGAS JR, C.; BOLZANII, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

YAQOOB, P. Monounsaturated fats and immune function. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 57, n. 4, p. 511-20, Nov 1998. ISSN 0029-6651 (Print) 0029-6651 (Linking).