

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DA CASCA
DO FRUTO DE *Punica granatum* SOBRE LESÃO MEDULAR EM RATOS**

CARLOS ROBERTO XAVIER SANTOS FILHO

Aracaju
Abril-2018

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DA CASCA
DO FRUTO DE *Punica granatum* SOBRE LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Dissertação de Mestrado submetido à
banca examinadora para obtenção do título
de Mestre em Saúde e Ambiente, na área
de concentração Saúde e Ambiente.

CARLOS ROBERTO XAVIER SANTOS FILHO

Orientadores
Margarete Zanardo Gomes Dr.
Ricardo Luiz C. de Albuquerque Junior Dr.

Aracaju
Abril, 2018

S237e Santos Filho, Carlos Roberto Xavier
Efeitos do tratamento com extrato aquoso da casca do
fruto de *Punica granatum* sobre lesão medular em ratos
/ Carlos Roberto Xavier Santos Filho; orientação [de]
Prof.^a Dr.^a Margarete Zanardo Gomes, Prof.^o Dr.^o
Ricardo Luiz Albuquerque Cavalcanti Júnior – Aracaju:
UNIT, 2018.

67 f. il. : 30cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) -
Universidade Tiradentes, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Hemisercção. 2. Punicaceae granatum. 3. Medula
espinhal. 4. *Punica grantum*. 5. Neuroproteção. I. Santos
Filho, Carlos Roberto Xavier. II. Gomes, Margarida
Zanardo. (orient.). III. Cavalcanti Junior, Ricardo Luiz
Albuquerque. (orient.). IV. Universidade Tiradentes. V.
Título.

CDU: 616.711-002001

SIB- Sistema Integrado de Bibliotecas

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM EXTRATO AQUOSO DA CASCA DO FRUTO DE
Punica granatum SOBRE LESÃO MEDULAR EM RATOS**

Carlos Roberto Xavier Santos Filho

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À BANCA EXAMINADORA PARA A
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE E AMBIENTE, NA ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO SAÚDE E AMBIENTE

Margarete Zanardo Gomes Dra.
Orientadora

Ricardo Luiz Albuquerque Cavalcanti Júnior Dr.
Orientador

Juliana Cordeiro Cardoso Dra.
Universidade Tiradentes

Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo Dra.
Universidade Tiradentes (Suplente)

Patricia Severino Dra.
Universidade Tiradentes

AGRADECIMENTOS

A Deus, o ponto de partida de todos os meus projetos de vida. Aos meus pais, Carlos Roberto e Jilvanete Oliveira, por não medirem esforços para investir nos meus sonhos, pela fé inabalável nas minhas conquistas e por energizar os meus dias com sorrisos orgulhosos. A meu irmão Jonatas, por todo suporte passado nesse tempo.

À minha orientadora, Margaret Zanardo Gomes, por toda ética, competência e dedicação, exemplo de seriedade, profissionalismo e liderança. Obrigado por acreditar em mim e ter me dado a oportunidade de realizar um sonho. Obrigado pelos “puxões de orelha”, os quais me impulsionaram a tentar melhorar sempre. Sua orientação foi essencial! MUITÍSSIMO obrigado, que Deus a abençoe!

Ao meu orientador Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, ensinando com humildade como ser um bom professor e pesquisador, pelas doses de incentivo e experiência compartilhada. É um profissional que admiro pelo amor, dedicação e empenho com a pesquisa. Obrigado pela preocupação e disposição sempre que a procurei, mesmo em meio a uma agenda corrida

À professora Silvana Floresta, pelas colaborações e paciência na execução do trabalho.

À minha namorada Emmanuelle Moura por todo companheirismo, conforto e incentivo que me passou durante todos os momentos. Muito obrigado meu amor!

Aos integrantes da família LMPE (Laboratório de Morfologia e Patologia Experimental), pelos ensinamentos, receptividade e conversas em todos os momentos em que precisei. Obrigado família!!! Aos ICS que me ajudaram durante toda a fase experimental do trabalho.

Meus amigos (Douglas, Neto, Bruno Sampaio e Filipe) agradeço por me apoiarem e entenderem meus momentos de ausência, sempre com palavras confortantes.

Meu muito obrigado aos companheiros de jornada (Bruno Felipe, Mayanna Machado e Juliana Passos) obrigado pelos ensinamentos de quem já passou por esta fase e pelas palavras de apoio! Vocês são o reflexo do carinho de Deus comigo.

Aos colaboradores do Biotério, por darem o apoio necessário para que os experimentos pudessem acontecer, por terem cuidado dos nossos animais. Muito obrigado!

À Fundação de Apoio à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC) e à Universidade Tiradentes (UNIT) pela bolsa concedida para que tornasse possível a realização da pesquisa, muito obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
2.1 Geral.....	11
2.2 Específicos	11
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.1 Medula espinal e lesão medular espinal	12
3.1.1 Fisiopatologia da Lesão Medular Espinal	14
3.1.2 Estratégias de Tratamento	17
3.2 Produtos Naturais	18
3.2.1 Punica granatum Linn	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Aspectos éticos.....	23
4.2 Coleta da casca de Punica granatum Linn.....	23
4.3 Obtenção do extrato aquoso das cascas de P. granatum	23
4.4 Método cromatográfico	24
4.5 Identificação e quantificação dos marcadores químicos no EACPG	25
4.6 Ensaio biológico.....	28
4.7 Procedimentos cirúrgicos de laminectomia e lesão medular	29
4.8 Avaliação da Função sensório-motora	29
4.9 Avaliação Histológica	30
4.10 Análise estatística	31
5. RESULTADOS	33
5.1 Otimização das condições cromatográficas	33
5.2 Identificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD-ESI/MS	35
5.3. Quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico	42
5.4 Avaliação Locomotora	43
5.5 Avaliação Histológica.....	45
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
ANEXO- REGISTRO DE APROVAÇÃO (PARECER CEUA)	65
ANEXO- VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	66

RESUMO

A lesão medular espinal (LME) é uma condição que pode levar a incapacidades permanentes. As estratégias terapêuticas visam reverter os eventos fisiopatológicos como a inflamação e o estresse oxidativo subjacentes a esta condição. Extratos da *Punica granatum* (*P. granatum*) apresentam ação anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da administração por via oral do Extrato Aquoso da Casca de *Punica granatum* (EACPG) sobre LME em ratos. Para tanto, o EACPG foi caracterizado quanto à composição química por meio de cromatografia líquida de alta eficiência. Para o ensaio biológico, 40 ratos adultos *Wistar* fêmeas foram divididos em 5 grupos: falso-operado (LAM) e os lesionados, tratados com veículo (Veículo, água destilada, 1 mL), EACPG a 100 mg/kg (EACPG100), EACPG a 300 mg/kg (EACPG300) e Metilprednisolona 30 mg/kg. A lesão por hemiseção foi realizada do lado direito. Os tratamentos foram administrados diariamente durante 28 dias. Para verificar o efeito dos tratamentos sobre a capacidade funcional, semanalmente, utilizou-se a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB). Aos 28 dias os animais foram eutanasiados para análise histológica. O tecido foi avaliado quanto ao número de neurônios e células da glia marcados por hematoxilina-eosina (HE). Os dados foram submetidos à análise de variâncias múltiplas com medidas repetitivas, sendo consideradas as variáveis tratamento e tempo, seguida do pós-teste de Bonferroni (avaliação funcional) ou à análise de variância de uma via seguida do pós-teste de Tukey (histologia). A análise cromatográfica permitiu identificar, no EACPG, o ácido gálico ($3,83 \pm 0,00$ mg/g de extrato) e o ácido elágico ($11,80 \pm 0,08$ mg/g de extrato). Ao 7º dia pós lesão os grupos tratados com EACPG a 100 e 300 mg/kg, bem como o grupo que recebeu metilprednisolona apresentaram médias significativamente maiores na avaliação funcional do que as do grupo lesionado tratado com veículo. Depois de 14 dias, os grupos EACPG100 e EACPG300, e o grupo que recebeu metilprednisolona apresentaram médias significativamente maiores que as do grupo lesionado tratado com veículo e o grupo EACPG100 apresentou valores médios significativamente maiores que os outros dois tratamentos. Em 21 dias, todos os demais tratamentos resultaram em aumento dos valores médios em relação ao grupo Veículo e não foram observadas diferenças entre os tratamentos a partir deste período. Finalmente, em 28 dias, apenas nos grupos tratados com EACPG 100 mg/kg e com metilprednisolona observou-se aumento dos escores médios em relação ao grupo lesionado tratado com veículo. A análise quantitativa do componente celular não mostrou qualquer diferença significativa no contingente de células da glia entre os grupos analisados. O mesmo comportamento foi evidenciado na análise quantitativa de neurônios, excetuando o grupo veículo, no qual o número médio destas células encontrado no lado direito foi significativamente menor que no lado esquerdo. Quando analisado o efeito dos diferentes tratamentos sobre o quantitativo de células nos cornos anteriores da medula espinhal, foi evidenciado que, no lado esquerdo (não lesado), não houve diferença entre os grupos seja em relação ao número médio de neurônios seja de células da glia. Contudo, do lado lesionado, o número médio de neurônios no grupo veículo se mostrou significativamente menor que no grupo laminectomia. Todos os demais grupos tratados apresentaram número médio de neurônios estatisticamente semelhantes ao grupo laminectomia; porém EACPG100 e Metilprednisolona apresentaram quantitativo de neurônios significativamente maior que o grupo veículo, o que não foi observado no grupo EACPG300. Além disso, apenas o grupo Veículo mostrou um número médio de células da glia maior que o grupo Laminectomia. Os grupos EACPG100 e Metilprednisolona exibiram número médio de células da glia significativamente menor que o grupo Veículo, mas não houve diferença entre este último e EACPG300. O EACPG nas doses de 100 e 300 mg/kg mostraram-se tão eficazes quanto o fármaco padrão Metilprednisolona em acelerar a recuperação funcional motora da medula espinal em ratos. O EACPG na dose de 100 mg/kg promoveu o reestabelecimento do número médios de neurônios e reduziu a gliose nas seções histológicas de medula espinal de maneira semelhante a Metilprednisolona. Assim, os resultados sugerem, portanto, que o EACPG possui uma ação neuroprotetora frente a lesão medular espinal por hemiseção torácica.

PALAVRAS-CHAVE: Hemiseção; *Punicaceae granatum*; Medula espinal; Neuroproteção.

ABSTRACT

Spinal cord injury (CML) is a condition that can lead to permanent disability. The therapeutic strategies aim to revert the pathophysiological events such as the inflammation and the oxidative stress underlying this condition. Extracts of *Punica granatum* (*P. granatum*) present anti-inflammatory, antioxidant and neuroprotective action. The aim of this study was to evaluate the effects of oral administration of the Aqueous Extract from the Bark of *Punica granatum* (EACPG) on LME in rats. For this, chemical composition of the EACPG was characterized by means of high performance liquid chromatography. For the biological assay, 40 female adult Wistar rats were divided into 5 groups: sham (LAM) and lesioned treated with vehicle (distilled water, 1 mL), EACPG at 100 mg/kg (EACPG100), EACPG at 300 mg/kg (EACPG300) and Methylprednisolone (30 mg/kg). Hemisection injury was performed on the right side of spinal cord at the thoracic segment. Treatments were administered daily for 28 days. Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) scale was performed weekly to assess the effect of treatments on functional recovery. At 28 days the animals were euthanized for histological analysis. The tissue was evaluated regarding the number of hematoxylin-eosin (HE) labeled neurons and glia cells. The data were submitted to the multiple variances analysis with repetitive measures, considering the variables treatment and time, followed by Bonferroni post-test (functional evaluation) or one-way analysis of variance followed by the Tukey post-test (histology). Chromatographic analysis allowed to identify gallic acid (3.83 ± 0.00 mg / g extract) and ellagic acid (11.80 ± 0.08 mg / g extract) in the EACPG. On the 7th postoperative day, the groups treated with EACPG at 100 and 300 mg/kg as well as the group receiving methylprednisolone had significantly higher mean values in the functional evaluation than those of the injured group treated with vehicle. After 14 days, the groups EACPG100 and EACPG300, and the group receiving methylprednisolone, presented mean values significantly higher than those of the injured group treated with vehicle; the group EACPG100 presented mean values significantly higher than the other two treatments. At 21 days, all other treatments resulted in an increase in the mean values in relation to the lesioned/vehicle treated group and no differences were observed between treatments after this period. Finally, in 28 days, only the groups treated with EACPG 100 mg/kg and with methylprednisolone showed an increase in mean scores in relation to the injured group treated with vehicle. Quantitative analysis of the cellular component did not show any significant difference in the number of glial cells between the groups analyzed. The same profile was evidenced in the quantitative analysis of neurons, except for the vehicle group, in which the mean number of these cells found on the right side was significantly lower than on the left side. When analyzed the effect of the different treatments on the mean number of cells in the anterior horns of the spinal cord, it was evidenced that, on the left side (not injured), there was no difference between the groups either in relation to the average number of neurons or of glial cells. However, on the injured side, the mean number of neurons in the vehicle group was significantly lower than in the laminectomy group. All other treated groups presented a mean number of neurons statistically similar to the laminectomy group; but EACPG100 and Methylprednisolone showed significantly higher mean number of neurons than the vehicle group, which was not observed in the EACPG300 group. In addition, only the Vehicle group showed an average number of glial cells greater than the Laminectomy group. The EACPG100 and Methylprednisolone groups had a significantly lower mean number of glia cells than the Vehicle group, but there was no difference between this latter and the EACPG300. EACPG at doses of 100 and 300 mg/kg showed to be as effective as the standard drug Methylprednisolone in accelerating the motor functional recovery after spinal cord injury in rats. EACPG at the dose of 100 mg/kg promoted the reestablishment of the mean number of neurons and reduced the gliosis in the histological sections of spinal cord in a similar manner to the Methylprednisolone. Thus, the results suggest, therefore, that the EACPG had a neuroprotective action against spinal cord injury by thoracic hemisection.

KEY-WORDS: Hemisection; *Punicaceae granatum*; Spinal cord; Neuroprotection.

1 INTRODUÇÃO

A lesão medular espinal (LME) é uma condição clínica devastadora com várias manifestações e incapacidades permanentes, tendo como danos a perda de funcionalidade parcial ou total da medula espinal (SIMÃO; PEREIRA, 2017).

A incidência da lesão medular espinal (LME) é de até 195,4 mil casos por milhão de habitantes em todo mundo (JAZAYERI *et al.*, 2015). Um novo estudo mostrou que a incidência no Brasil seja de 16 a 26 mil pacientes por milhão por ano (BOTELHO *et al.*, 2014).

As causas mais frequentes de LME são de origem traumática (90%), ocasionadas por acidente automobilístico, quedas, violência e atividades desportivas. A idade média dos pacientes com lesão aumentou de 29 anos durante a década de 1970 para 42 atualmente (*National Spinal Cord Injury Statistical Center*, 2016) e foi sugerido que até o ano 2020 a LME se tornará a terceira maior causa de incapacidade e morte em adultos (ZEINALIZADEH 2015; HARNISH 2016).

A metilprednisolona (MP) é um dos medicamentos mais populares utilizado no tratamento clínico em indivíduos com LME. No entanto, sua eficácia em promover o efeito neuroprotetor tem sido questionada e a ocorrência de efeitos adversos como infecção e embolia pulmonar causam hesitação sobre o uso prolongado (KIM *et al.*, 2017; BOWERS CA, 2016).

Diante da complexidade que abrange os eventos fisiopatológicos como a inflamação e o estresse oxidativo, fatores preponderantes na fisiopatologia da LME, no entanto, é na lesão secundária que ocorre uma grande perda de neurônios, excitotoxicidade (Dorsett *et al.*, 2016), apoptose (Crowe *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1997), ocorre processo inflamatório mediado por células inflamatórias como macrófagos, micróglia, células T e infiltrados de neutrófilos (FEHLINGS, 2016). Nesse contexto, é importante a descoberta de estratégias terapêuticas que dirimam ou inibam esses processos (JIA *et al.*, 2012) e possam conter os eventos secundários da lesão, proporcionar o crescimento axonal, e simultaneamente, promovam a recuperação das conexões com estruturas alvo (COUGHLAN 2013; FEHLINGS 1991; JING *et al.*, 2013).

Não existem tratamentos capazes de reverter completamente os danos neuronais ocasionados pela LME, mas sabe-se que a utilização de moléculas bioativas podem gerar condições favoráveis ao crescimento axonal devido às suas ações antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora (PEI *et al.*, 2017).

A literatura mostra que extratos de *Punica granatum* Linn (*P. granatum*), popularmente conhecida como romã (TEIXEIRA DA SILVA *et al.*, 2013), apresentam ação anti-inflamatória (LEE *et al.*, 2010; ISMAIL *et al.*, 2012), antioxidante (BAGRI, *et al.*, 2010; CELIK *et al.*, 2009; PRAKASH, PRAKASH, 2011; WANG, *et al.* 2013) analgésica (TRUJANO *et al.*, 2015) e

neuroprotetora em modelos experimentais para estudo da doença de Alzheimer (AHMED *et al.*, 2014a; HARTMAN *et al.*, 2006), acidente vascular encefálico (AHMED *et al.*, 2014b) e frente ao estresse oxidativo neuronal *in vitro* e *in vivo* (CELIK *et al.*, 2013; FOROUZANFAR *et al.*, 2013).

A casca de romã corresponde a cerca de 50% do peso total da fruta e compostos bioativos como ácido elágico e seus derivados e elagitaninos como punicalina e punicalagina são encontrados em maiores concentrações nas cascas (GULLON *et al.*, 2016). Estes são os principais responsáveis pelas atividades biológicas atribuídas à planta (AFAQ *et al.*, 2005a; VIUDA-MARTOS *et al.*, 2010). Mais especificamente, os elagitaninos têm sido relacionados ao potencial cicatrizante e neuroprotetor atribuído aos compostos polifenólicos da fruta (QU *et al.*, 2012; AHMED *et al.*, 2014a, b; CELIK *et al.*, 2013) e Nascimento (2013) observou que o extrato aquoso apresentou as maiores quantidades de ácido elágico.

Dessa forma, tendo em vista a importância dos eventos secundários como a neuroinflamação e estresse oxidativo para a progressão do quadro após LME e as atividades biológicas da *P. granatum*, incluindo a ação neuroprotetora, e de seus componentes químicos, encontrados destacadamente na casca e obtidos por extração em água, o extrato aquoso da casca de *P. granatum* (EACPG) pode ser uma possível estratégia terapêutica para tratamento

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar os efeitos da administração via oral do Extrato Aquoso da Casca de *Punica granatum* (EACPG) sobre lesão medular em ratos.

2.2 Específicos

- Obter e caracterizar quimicamente o EACPG;
- Avaliar os efeitos do tratamento sobre recuperação funcional ao longo do tempo por meio do teste de avaliação funcional (motora);
 - Avaliar o efeito neuroprotetor sobre a morte neuronal.
 - Avaliar o efeito do EACPG sobre as respostas mediadas por células da glia (microglia, astrócitos e oligodendrócitos).

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Medula espinal e lesão medular espinal

A medula espinal é a estrutura neural responsável por conduzir impulsos elétricos, aferentes e eferentes, entre o encéfalo e o restante do organismo. Localizada dentro do canal medular, é comumente lesionada em casos de traumas diretos ou indiretos na coluna vertebral, o que pode resultar em déficit motor e sensitivo, repercutindo em limitação funcional para o indivíduo (SILVA *et al.*, 2012).

A medulla espinal é representada por possuir alargamento nas áreas cervical inferior e lombosacra conhecidos como intumescências cervical e lombossacral. Esses alargamentos são formados por grandes quantidades de corpos de células nervosas e projeções que se acumulam para formar os plexos braquial e lombossacral, responsáveis por fazer a inervação dos membros superiores e inferiores, respectivamente. A mais importante função da medula espinal consiste em remeter, receber e fornecer estímulos em forma de informações motoras e sensoriais que são transmitidas do encéfalo para todas as áreas do corpo (MOORE *et al.*, 2013).

A eficácia de fibras e células que compõem o sistema nervoso central (SNC) que atuam na restauração após Lesão Medular Espinal (LME) é insuficiente. Dessa forma, a LME é uma injúria excessivamente agressora e exaustiva. Aparece com grande frequência, além de gerar danos neurológicos severos e dispõe de um alto índice de mortalidade estimado em 5% dos acometidos (NSCISC, 2015).

Por acometer principalmente indivíduos adultos jovens do sexo masculino, entre os 30 e 42 anos, e gerar sequelas motoras restritivas e incapacitantes, na maioria das vezes irreversíveis, o traumatismo medular deve ser alvo de atenção das políticas públicas de saúde (ANDRADE; GONÇALVES, 2007; SHAH; TISHERMAN, 2014).

Após a LME no sistema nervoso central do adulto os axônios têm uma grande dificuldade em se regenerar. Esta falta de regeneração pode ser atribuída à diminuição da ativação de programas de crescimento intrínseco e um ambiente local. Ambos necessitam de moléculas que permitem o crescimento axonal e a remoção de moléculas que inibem este crescimento (KEEFE *et al.*, 2017).

Atualmente, não existe uma terapia específica e eficaz para restaurar a função nervosa após LME (MEIJA 2015). Nesse contexto, danos à medula espinal podem acarretar em limitações de movimentos voluntários de forma total ou parcial abaixo do nível da lesão. Após um trauma da medula espinal há o bloqueio da transmissão nervosa abaixo do nível da lesão e para os nervos espinais relacionados a essas áreas (*American Spinal Injury Association*, 2013).

De acordo com a *American Spinal Injury Association – ASIA* (2013) dependendo do

nível medular em que ocorrem os ferimentos, a LME pode resultar numa paralisia dos músculos usados para respiração, paralisia ou perda da sensação do tronco, braços e pernas, fraqueza, dormência e perda do controle do intestino e da bexiga e numerosas condições secundárias incluindo problemas respiratórios, úlceras de pressão e picos, por vezes, fatais na pressão sanguínea.

A Tetraplegia geralmente descreve a condição de uma pessoa com lesões na região cervical da medula espinal. Este indivíduo pode experimentar perda de sensibilidade e paralisia dos membros superiores e membros inferiores. Paraplegia é o termo genérico para descrever a condição de uma pessoa que perdeu sensação ou não é capaz de mover as partes mais baixas do seu corpo e que sofreu um trauma no nível da primeira vértebra torácica (T1) a quinta vértebra sacral (S5). As partes do corpo que podem ser afetadas são o tronco e os membros inferiores (ASIA, 2013). (Figura 1)

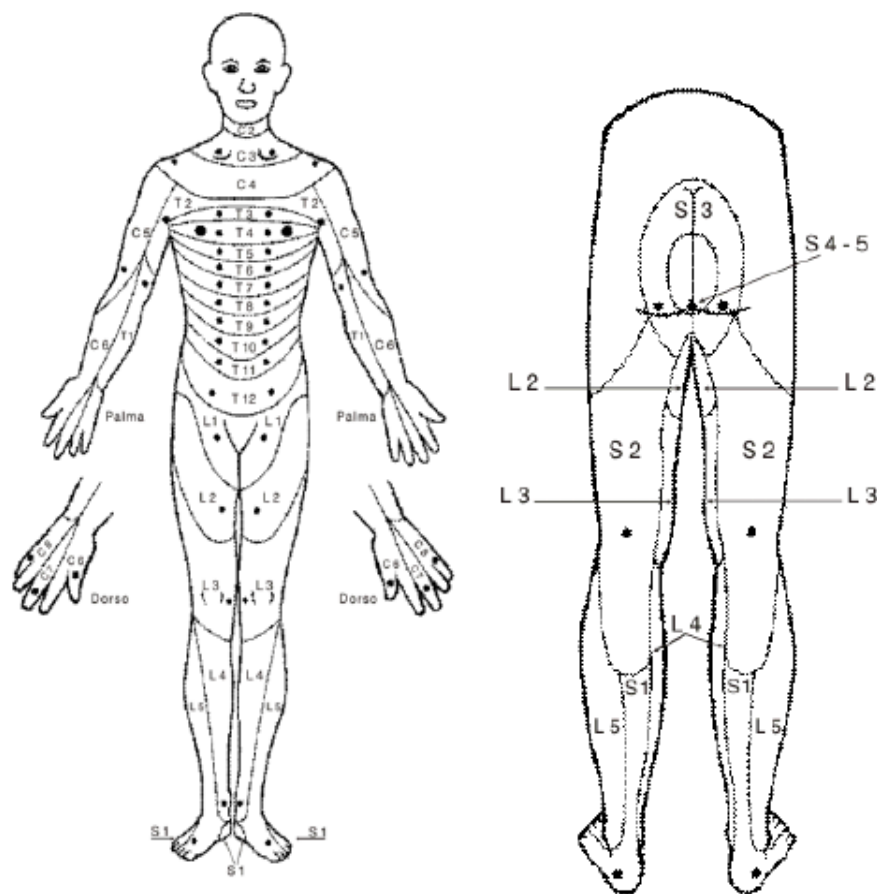


FIGURA 1: Segmentos acometidos no trauma medular.
FONTE: NSCISC 2009; HEGEN 2012, SARAH, 2011.

Além de todo comprometimento motor, modificações na sensibilidade e sinais da dor, no funcionamento vesical, intestinal, sexual e psicológicas podem ocorrer. A fase de reabilitação pode ser iniciada com o objetivo de tentar retomar os danos neurológicos causados pela LME e evitar complicações, proporcionar a independência funcional e

recuperar as atividades sociais buscando, portanto, a melhoria da qualidade de vida dos pacientes (BRASIL, Ministério da Saúde, 2015).

De acordo com o o *National Spinal Cord Injury Statistical Center* (NSCISC, 2016), a LME pode se apresentar de duas formas, traumática ou não traumática, a depender de sua causa, completa ou incompleta, dependendo do nível da lesão que foi afetado e de sua gravidade.

Na classificação de comprometimento neurológico padrão fornecida pela ASIA são determinados graus de lesão de ASIA A (completa) à ASIA E (normal sensorial/ motor), com B, C e D representando diferentes graus de lesão entre elas (KRETEZER, 2016):

Lesão ASIA A: Completa - sem sensibilidade e função motora nos seguimentos sacrais S4-S5.

- Lesão ASIA B - Sensitivo Incompleto: apresenta sensibilidade, mas não função

motora abaixo do nível neurológico, estendendo-se até os seguimentos sacrais S4-S5.

- Lesão ASIA C - Motor Incompleto: A função motora está preservada abaixo do nível neurológico; porém, mais da metade das funções dos músculos-chave são acometidos abaixo do nível da lesão neurológica.

- Lesão ASIA D – Motor Incompleta: A função motora está preservada abaixo do nível neurológico e, pelo menos, metade das funções dos músculos-chave abaixo do nível neurológico têm um grau muscular maior ou igual a 3.

- Lesão ASIA E - Normal: é aquela na qual, apesar do trauma medular, no momento da avaliação, as funções motoras e sensitivas foram consideradas normais em todos segmentos abaixo do nível neurológico – apesar de em algum momento ter sido constatado déficits motores e sensitivos.

A depender do nível de gravidade da lesão, o quadro neurológico da LME é determinado pela complexidade de eventos primários e secundários que estão relacionados às fases de desenvolvimento da injúria. (ZAO *et al.*, 2011; JIA *et al.*, 2012)

3.1.1 Fisiopatologia da Lesão Medular Espinal

A fisiopatologia da LME é melhor descrita como bifásica, constituindo-se de uma lesão primária ou inicial e uma lesão secundária (KIM, 2017). Nessas duas lesões ocorrem um grande número de eventos celulares e moleculares (CALVINOS *et al.*, 2016).

A lesão primária é o resultado do impacto direto sobre a medula espinal, aumentando a compressão, que leva à um dano axonal. Esse tipo de lesão pode ser resultante de uma transecção ou laceração da medula espinal, ocasionando em secção parcial ou total (Siddiqui *et al.*, 2015).

Já a lesão secundária é uma lesão tecidual progressiva após a LME. Durante esta

lesão é iniciada uma cascata de eventos secundários, que envolvem processo inflamatório mediado por células inflamatórias como macrófagos, micróglia, células T e infiltrados de neutrófilos chegam ao local por quimiotaxia (FEHLINGS, 2016). Estas células desencadeiam a liberação de citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Interleucina (IL) 1 α , IL-1 β e IL-6 (NAJKAMURA 2003; ULNDREAJ 2016). A lesão secundária inclui a morte neuronal e degeneração axonal, formação de cicatriz glial e ativação da micróglia (ZHANG, 2016).

O processo de lesão secundária pode ser dividido nas fases aguda, subaguda (ou intermediária) e crônica, de acordo com o tempo pós-lesão e os mecanismos subjacentes (KIM, 2017). Nas primeiras duas horas após o trauma é iniciada a fase imediata onde há morte neuronal e glial seguida de choque medular e alterações funcionais motoras no nível da lesão e abaixo (DITUNNO *et al.*, 2004; NORENBORG *et al.*, 2004; BOLAND *et al.*, 2011).

As células da glia também são comprometidas, sendo os oligodendrócitos os mais danificados, uma vez que apresentam maior permeabilidade ao cálcio e sofrem sensibilização por ciclo-oxigenase, resultando em morte por excitotoxicidade (PROFYRIS *et al.*, 2004; CARLSON *et al.*, 2010; GERARDO NAVA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013).

Ocorre ainda o surgimento de pontos hemorrágicos distantes do sítio da lesão original como resultado da perda de integridade estrutural dos capilares sanguíneos e há o aumento da expressão do TNF- α e IL-1 β (DONNELLY; POPOVICH, 2008; DAVID; KRONER, 2011).

Entre 2 e 48 horas após o trauma medular inicial ocorre a fase aguda. Nesse momento, uma volumosa área hemorrágica é formada, que vai resultar em isquemia (TATOR; FEHLINGS, 1991). Esta manifestação é importante, uma vez que a hemoglobina liberada é tóxica às células do SNC, aumentando o volume de tecido neural danificado. A isquemia e o processo hemorrágico estão relacionados a permeabilidade da barreira hematoencefálica e hematoespinhal, uma vez que a lesão medular causa uma interrupção nessas barreiras, atingindo uma interrupção máxima 2 horas após o trauma e retornando a níveis fisiológicos 2 semanas depois do trauma inicial (FIGLEY *et al.*, 2014).

Durante as primeiras 24 horas após o trauma inicial, acontece um processo chamado choque medular, ou seja, a ausência de reflexos espinhais caudais. O choque medular é diferente do choque neurogênico, durante o choque medular o paciente apresenta condições de hipotensão e bradicardia devido a diminuição da resistência vascular periférica, enquanto que o choque neurogênico está associado à interrupção das funções neurais distantes à lesão, como força motora, sensibilidade e reflexo (DITUNNO *et al.*, 2004).

Além disso, ocorre a infiltração de células do sistema imune para o SNC, tais como células T, neutrófilos e monócitos, ocasionadas pela interrupção das barreiras hematoencefálicas e hematoespinhal. As micróglias continuam a proliferação e se ativam durante a fase aguda, resultando na liberação de quimiocinas e citocinas (DONNELLY;

POPOVICH, 2008; TZEKOU; FEHLINGS, 2014). Dessa forma, durante as primeiras 24 horas após o trauma medular, os neutrófilos chegam ao sítio da lesão e há liberação de citocinas, metaloproteinases (MMPs), mieloperoxidase e espécies reativas de oxigênio.

No entanto em 48 horas os neutrófilos já não são mais os mesmos e ocorre uma migração dos monócitos. Já em 72 horas, acontece um aumento da lesão secundária, uma vez que os monócitos chegam na corrente sanguínea e tornam-se macrófagos e há liberação de glutamato, TNF- α , IL-1 β , IL-6 e prostanóides (LESKOVAR *et al.*, 2000; SCHWAB *et al.*, 2000).

Após os primeiros 7 dias pós a lesão medular inicial, é iniciada uma redução de macrófagos Tipo 1, porém a micróglia persiste ativa por semanas (DONNELLY; POPOVICH, 2008). Os eventos que marcam o final da fase aguda são a morte celular por apoptose e a desmielinização (YU *et al.*, 2009).

Os astrócitos tornam-se hipertróficos e proliferativos entre os primeiros dois dias e duas semanas da LME, além de iniciar-se a formação da “cicatriz glial” a qual é responsável por uma barreira física e química para a regeneração dos axônios da medula espinhal (KARIMI-ABDOLREZAEI *et al.*, 2010; KARIMI-ABDOLREZAEI *et al.*, 2012; YOUNG, 2014).

A fase subaguda (ou intermediária) tem início entre 14 e 21 dias após o trauma e tem duração aproximada de 6 meses. Nessa fase, a reação de gliose continua até a cicatriz glial se formar por completo. A cicatrização glial é um acontecimento fundamental na recuperação de lesões no SNC, pois o acúmulo de astrócitos leva à expansão da área da lesão e uma perda de macromoléculas através da barreira hematoencefálica que se encontra comprometida (FAULKNER *et al.*, 2004; MYER *et al.*, 2006). Os astrócitos passam a produzir moléculas inibitórias a partir da cicatriz glial que proporcionam a falha na regeneração axonal (FITCH; SILVER, 2008).

A partir do sexto mês após o trauma inicial é que uma LME é considerada crônica. Nessa fase a cicatriz glial e os cistos na medula espinhal já estão definidos e desenvolvidos. A necrose do tecido neuronal resulta em cistos e representam uma barreira física que impossibilita a regeneração axonal. Nesse momento a degeneração walleriana se estende e pode durar anos até que os corpos celulares e os restos de axônios sejam totalmente removidos do sítio da lesão (FLEMING *et al.*, 2006; KRAMER *et al.*, 2013). O decurso temporal das alterações na medula espinhal após lesão estão representados na figura 2.



FIGURA 2: Eventos fisiopatológicos após LME. Representados em suas respectivas fases.

FONTE: Adaptado de Siddiqui *et al.*, 2015

Todos os eventos citados causam impedimento da regeneração, além da perda de tecido e incapacidade funcional (HE; NAN, 2015). Portanto, o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento para favorecer o processo de neurorregeneração e controlar a ativação glial pode ser benéfica no tratamento da LME (ZHANG, 2016).

3.1.2 Estratégias de Tratamento

As vias de danos secundários oferecem potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da LME por permitir intervenções que favoreçam uma maior recuperação funcional (Profyris *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2015a). A metilprednisolona (MP), um glicocorticoide sintético utilizado para tratar doenças inflamatórias, é bastante utilizada no tratamento de indivíduos com LME. Estudos demonstraram que a MP inibe a inflamação, o estresse oxidativo e a apoptose neuronal, contribuindo para o efeito neuroprotetor na recuperação funcional após a LME (VAQUERO *et al.*, 2006; GOCMEZ *et al.*, 2015).

Apesar das dificuldades em alcançar terapias que propiciem a completa recuperação desde o trauma inicial, cada vez mais terapias experimentais têm surgido e demonstrado sucesso no tocante à regeneração medular espinal após lesão (MAIER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2010). Os métodos de tratamento durante a fase aguda da LME são frequentemente limitados a doses elevadas de corticoides (FEHLINGS, 2011), estabilização cirúrgica e descompressão, para atenuar os danos adicionais (PE, 2013). O transporte de células tronco é um novo método de tratamento para LME. No entanto, os papéis destes métodos na recuperação funcional após a LME continuam controversos (HE e NAN, 2016).

Ahuja *et al.* (2016) recomendam a manutenção da pressão arterial média (PAM) ≥ 85 a 90 mm Hg durante 7 dias após a LME e foi encontrado melhora nos resultados da pressão arterial ao longo prazo. Veronez *et al.* (2016) Utilizaram a terapia através do laser com várias doses elevadas, que foram eficazes na promoção da recuperação funcional e modulação do processo inflamatório após LME em ratos. Há, ainda, abordagens que buscam restituir ou substituir funções perdidas por meio de transplantes celulares variados (GISZTER, 2008; VAWDA e FEHLINGS, 2013). Zhang (2016) em seu estudo utilizou a erva chinesa Puerarin com forma de tratamento após LME e relatou eficácia frente aos efeitos da regeneração axonal, recuperação funcional e diminuição da inflamação.

Em relação a novas abordagens terapêuticas, pode-se citar o estudo com ratos de Paterniti *et al.*, (2011) relatando que a aplicação de adenosina tem efeito protetor sobre a LME, agindo sobre receptores glutamatérgicos diminuindo a excitotoxicidade. Abrams *et al.*, (2012) encontraram indícios de que o imatinibe, um inibidor da tirosina quinase, utilizado clinicamente para tratamento de câncer, possui efeito significativamente protetor sobre neurônios e outras células do tecido medular após LME em ratos. Yu *et al.*, (2012) encontraram evidências de que o ácido valpróico influencia a restauração da hiperacetilação e redução da resposta inflamatória resultante da LME, sendo eficaz na recuperação da função motora em ratos.

Técnicas fisioterapêuticas auxiliam ainda no fortalecimento muscular, melhorando o controle de tronco e consequentemente a capacidade de manutenção postural. Além dos exercícios, alguns medicamentos como os benzodiazepínicos, cloridrato de imipramine gabapentina e toxina botulínica tipo A podem ser utilizados para como forma de tratamento, diminuindo a característica espástica da lesão. Estes tratamentos beneficiam não apenas a saúde física do indivíduo, como também sua condição psicossocial, uma vez que a limitação da mobilidade é um fator significativo de exclusão social (SILVA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, produtos naturais como a própolis vermelha e a romã, que tem em sua composição substâncias com atividade antioxidante e anti-inflamatória podem representar uma importante ferramenta farmacológica na redução dos danos causados pela lesão medular secundária, evitando a progressão das cascatas de eventos químicos subjacentes ao processo (TY *et al.*, 2009; MANDALARI *et al.*, 2011).

3.2 Produtos Naturais

A sustentabilidade de um país depende de um consistente plano político, que abrange os aspectos de educação, ciência, tecnologia e inovação, amparada pela preservação da biodiversidade, através da utilização racional de fontes naturais, de modo a atender às necessidades básicas dos seres vivos, além do avanço social e econômico, num cenário que assegura o equilíbrio ordenado do meio ambiente e seres vivos. A biodiversidade das florestas

tropicais serve como foco para a descoberta de plantas medicinais promissoras para a cura de doenças e agravos à saúde. A relação de plantas tropicais e seus predadores naturais podem ser utilizadas como uma base para achados de substâncias ativas e como resultado uma forma de direcionar as análises farmacológicas (BRAZ-FILHO, 2010).

O Brasil é considerado um grande consumidor de produtos naturais. O aumento significativo na aplicação de plantas medicinais por indivíduos vem beneficiando a implementação desses produtos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), através de políticas públicas na área da saúde, que já conta com 16 Estados em que o produto natural é disponibilizado (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além disso, se destaca pela sua ampla biodiversidade vegetal, e por possuir maiores perspectivas para exploração econômica de medicamentos é um dos países de maior número de espécies do mundo, representando em torno de 19% da flora mundial, com expressivo potencial genético e do número de espécies nativas, possui excelente condição climática e grande potencial hídrico, como as plantas medicinais provêm dessa diversidade podem ser aplicadas a qualquer classe socioeconômica (BENINI *et al.*, 2010; GUILHERMINO, 2015).

O conhecimento de sistema únicos terapêuticos e utilização de produtos naturais são amplamente aceitos pela população rural quanto urbana, devido a sua grande diversidade biológica, étnica e cultural e socioeconômica que formam a população brasileira (ROCHA *et al.*, 2015).

O incentivo às pesquisas, estudos e desenvolvimentos tecnológicos, são ações de estímulo das políticas públicas para sensibilizar profissionais da saúde na prescrição de medicamentos e produtos fitoterápicos disponíveis nas unidades de saúde. Transformando a fitoterapia não apenas em uma terapia alternativa e complementar, mas em alguns casos, um tratamento de primeira escolha para usuários do SUS (OSHIRO *et al.*, 2016).

Produtos naturais cada vez mais tem sido alvo de pesquisas, que têm possibilitado a produção de novas drogas pela identificação de novos compostos bioativos com resultados promissores relacionados à ação neuroprotetora. Os fitoquímicos possuem um mecanismo de ação que atua em desordens neurodegenerativas e pode ser descrito como: (1) redução do estresse oxidativo por suas atividades antioxidantes; (2) impulsionando a fagocitose pelas células de defesa; (3) aumento da concentração de neurotransmissores nas proximidades dos neurônios para impedir a clivagem destes pelas enzimas; (4) adaptação dos neurônios a condições de estresse que afetam as suas propriedades e (5) inibição da ação da acetilcolinesterase (AChE) (VENKATESAN *et al.*, 2015).

O medicamento fitoterápico apresenta um custo relativamente alto de pesquisa e produção, não devendo ser confundido com medicina popular ou alternativa. São submetidos a intensa fiscalização e controle por parte da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para comprovação dos seus efeitos benéficos, enquanto a medicina popular

perpassa apenas pelos conhecimentos empíricos de uma população, não havendo estabelecimento de critérios científicos em sua utilização. Sendo assim, é de fundamental importância cada vez mais investir em pesquisas que possibilitem a investigação de recursos vegetais existentes no Brasil, com o propósito de detectar possíveis benefícios de seu consumo para a população, bem como avaliar sua reprodutibilidade, eficácia e segurança do seu consumo (REZENDE; COCCO, 2002; VIEIRA *et al.*, 2010).

Acredita-se que o uso de produtos naturais não apresente riscos à saúde, porém ao contrário do que se pensa os produtos naturais podem apresentar vários agravos à saúde incluindo reações alérgicas, tóxicas, interações medicamentosas e efeitos mutagênicos. Diversos grupos de plantas possuem substâncias bioativas de interesse farmacológico. No Brasil, e em outros países, o intuito a atividade, esclarecer mecanismos de ação, ou mesmo, identificar componentes ativos e investigar os possíveis efeitos tóxicos de diferentes espécies vegetais (BELCAVELLO, 2012)

Desta forma Oliveira *et al.*, (2012) abordaram que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial faz o uso de plantas medicinais nas precauções com a saúde, sendo que aproximadamente 10.000 plantas têm seu uso medicinal documentado. Nesse caso, estudos pré-clínicos que contém produtos naturais como forma de tratamento buscam por novas estratégias terapêuticas que minimizem os danos causados pela LME (LEE *et al.*, 2005; GENOVESE *et al.*, 2010; ZHAO *et al.*, 2011).

Na biodiversidade da flora brasileira, a *Punica granatum* Linn. (*P. granatum*) destaca-se pelas diversificadas ações biológicas.

Embora não seja considerada uma espécie vegetal nativa do Brasil, e sim da Ásia Central, é cultivada mundialmente em outras regiões como Oriente Médio, Mediterrânea da Ásia, Américas do Norte, Sul e Central, África e Europa (HASNAOUI *et al.*, 2012). Apresenta larga distribuição por todo o território brasileiro, principalmente no Nordeste (MIGUEL *et al.*, 2010).

3.2.1 Punica granatum Linn

Arbusto grande que mede de dois a quatro metros de altura, lenhoso, ramificado, nativo da Ásia Central e cultivado mundialmente (HASNAOUI *et al.*, 2012). A família *Punicaceae* é uma família de duas espécies, *Punica granatum* e *Punica protopunica*. A *Punica granatum* é uma planta cultivável em clima tropical e semitropical (LORENZI; SOUZA, 2001; LEE *et al.*, 2010).

A Romã (*P. granatum*) foi uma das primeiras frutas utilizadas para consumo humano. SHAYGANNIA *et al.* (2015) encontraram que atualmente essa planta é cultivada em mais de 100 países, incluindo Irã, Espanha, Itália, Afeganistão, Estados Unidos, Índia, China, Rússia, Uzbequistão, Marrocos e Grécia. Sua nomenclatura varia de acordo com o país, no Brasil a

P. granatum é popularmente conhecida como romãzeira e seu fruto como romã

(CURRO *et al.*, 2010).

Dessa forma, após a *P. granatum* chegar no Brasil, foram encontradas condições favoráveis para o crescimento vegetativo, florescimento, frutificação e produção de frutas de primeira qualidade. Moreira (2015) pode observar em estudo que quando comparado a *P. granatum* cultivada na Turquia com a *P. granatum* produzida no Brasil, a do território brasileiro teve melhores resultados obtendo valores maiores das propriedades químicas e oxidantes.

A produção de romã no Brasil apresenta um grande crescimento, especialmente na região semi-árida. O Nordeste brasileiro apresenta condições favoráveis para o cultivo. (CARDOSO *et al.*, 2011). Com o aumento do consumo gerado pelas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos, a área cultivada no Brasil tem se expandido (MOREIRA *et al.*, 2015).

O aumento na procura pela romã está associado à elevada quantidade de compostos bioativos e às evidências científicas dos seus benefícios a saúde humana (YANG *et al.*, 2016; AKHTAR *et al.*, 2015). A romã tem uso farmacológico e apresenta um amplo potencial fitoquímico de valor medicinal. A árvore é dividida em partes para estudo das atividades farmacológicas, raiz, caule, folhas, flores, frutos (casca, suco e semente) que foram descritos por suas ações antioxidante.

Na polpa da romã são encontrados diversos fenólicos, especialmente a punicalagina (ROJANATHAMMANEE *et al.*, 2013), que seriam os responsáveis pelo efeito neuroprotetor. O papel biológico da romã tem sido aplicado à propriedade antioxidante fornecida pelos compostos fenólicos como ácido gálico, ácido elágico e punicalagina (alfa e beta) dois polifenóis únicos da romã (JOHANNINGSMEIER; HARRIS 2011). (figura 2)

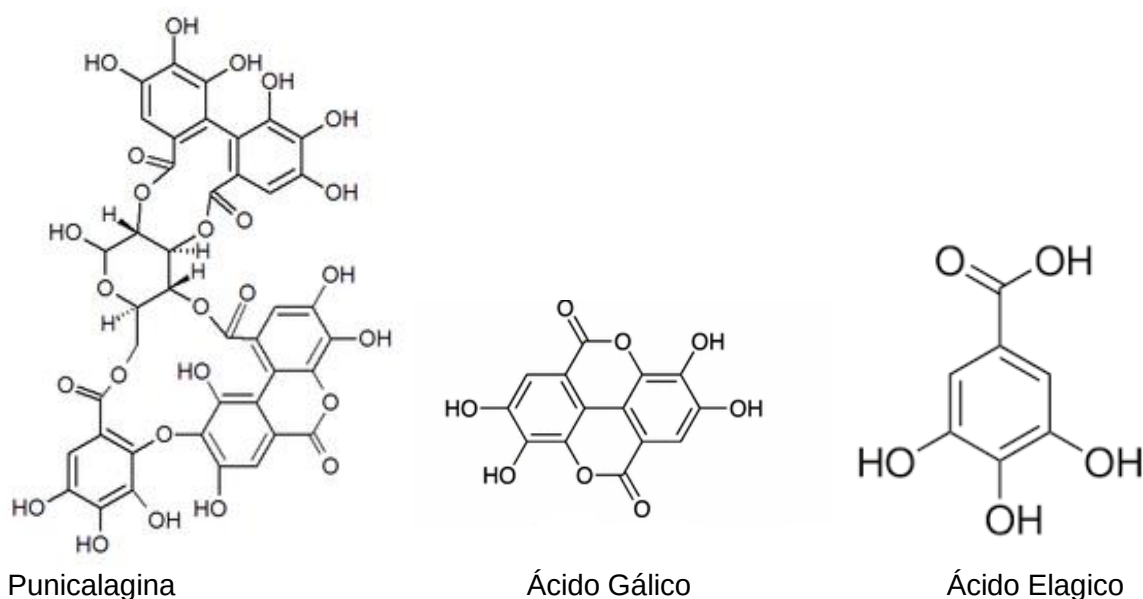


FIGURA 3: Estrutura química de Punicalagina, Ácido Gálico e Ácido Elágico, compostos presentes na romã.

FONTE: adaptado de Viladomiu *et al.*, (2013)

Os componentes bioativos e as ações farmacológicas da *P. granatum* indicam uma gama de aplicações clínicas para o tratamento e prevenção de doenças crônicas como Alzheimer, câncer, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (AKHTAR *et al.*, 2015). Estes efeitos preventivos proporcionados pela romã são desencadeados pela atividade antioxidante do fruto, tendo os compostos fenólicos como os principais responsáveis (OZGEN *et al.*, 2008; BOROCHOV – NEORI *et al.*, 2009; CHANDRASEKARA; SHAIDI 2011).

Estes compostos são importantes para a cognição e aumento da expressão de neurotrofinas através da sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, principalmente o BDNF. O BDNF é uma neurotrofina reconhecida por possuir uma grande influência na preservação, sobrevivência, crescimento e diferenciação de neurônios, atuando na reversão da atrofia neuronal (GOMEZ-PINILLA; NGUYEN, 2012).

O ácido elágico, também classificado como ácido hidrobenczoico, é detectado em grande quantidade nas folhas, na semente e no suco desta planta. Foi constatado que possuem ações antioxidantes, antitumoral e anti-aterosclerótico (QU *et al.*, 2012).

A *P. granatum* é um potente antioxidante, com atividade semelhante ao chá verde e superior ao vinho tinto (PRAKASH, PRAKASH, 2011). Possui um elevado índice de taninos, estão dispostos em várias partes da planta, como em raiz, galhos, folhas, flor, frutos e sementes, por isso são utilizados por possuírem propriedades medicinais antitumoral (SEIDI *et al.*, 2016), anti-inflamatória (ZEKAVAT, 2016), anti-helmíntica (ALI, *et al.*, 2015) e antioxidante (BOUASLA *et al.*, 2016).

Braidy *et al.* (2013) mostraram em seu estudo utilizando vários tipos de extrato da *P. granatum* que os mesmos foram eficazes em diminuir o estresse oxidativo induzido em neurônios primários, por possuírem grande teor de fenólicos e apresentaram um efeito neuroprotetor maior.

Rojanathammanee *et al.*, (2013) analisaram o efeito do extrato aquoso da polpa da romã em camundongos transgênicos (modelo de Doença de Alzheimer). O consumo do extrato causou efeito anti-inflamatório no cérebro que possivelmente poderia diminuir a progressão da doença.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade Tiradentes (UNIT/ Aracaju/SE) sob o número de protocolo 010716R (ANEXO1), seguindo as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Coleta da casca de *Punica granatum* Linn

Os frutos da *P. granatum* foram coletados no mês de setembro de 2016, no município de Petrolina, na mesorregião do São Francisco, no semiárido de Pernambuco, extremo oeste do estado, cujo plantio faz parte do Projeto Irrigado Senador Nilo Coelho: N9, com localização geográfica: 9° 23'34"S 40° 30'28"O. A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo herbário da Universidade Tiradentes (UNIT), local destinado à realização do voucher e depósito da exsicata nº 20881.



Figura 4: Registro Científico (Exsicata nº 20.881), da amostra de *Punica granatum*
Fonte: Nascimento (2013)

4.3 Obtenção do extrato aquoso das cascas de *P. granatum*

Os frutos da *P. granatum* foram lavados em água corrente para a retirada das impurezas existentes na casca da romã e em seguida submetidos à secagem completa em ambiente arejado e ventilado. Após secagem, a casca da romã foi separada dos arilos polposos e as amostras foram acondicionadas em bolsas plásticas transparentes e mantidas sob-refrigeração a -20°C (BASTOS, 2014) (**figura 5. A**). As cascas da romã anteriormente congeladas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar, com temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$ por um período de 48 a 72 h, até a secagem completa (**figura 5.B**). Posteriormente, as cascas foram quebradas em pedaços menores por ação mecânica (**figura 5.C**) e submetidas ao moinho de facas (**figura 5.D**). O pó resultante foi submetido à granulometria de 32 mesh (**figura 5.E**) e conservado em frasco de vidro âmbar até o preparo do extrato aquoso (BASTOS, 2014).

O material vegetal foi submetido à extração aquosa sob agitação mecânica, na proporção de 5 g/500 mL (m/V), durante 2 h, em temperatura ambiente (**figura 5.F**). Ao final

deste processo, procedeu-se à filtração (**figura 5. G**) e o sobrenadante colocado em placas de petri previamente pesadas (**figura 5.H**) e após eliminação do solvente em estufa de circulação de ar com temperatura de $50 \pm 5^\circ\text{C}$ durante sete dias. Após a evaporação completa do solvente as placas foram novamente pesadas (**figura 5.I**) e o material resultante (extrato seco) foi raspado (**figura 5.J**), calculado o rendimento (**equação 1**) e posteriormente armazenado sob-refrigeração em frasco âmbar devidamente identificado (**figura 5.K**) (BASTOS, 2014).

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Massa do extrato sólido}}{\text{Massa do pó da casca do fruto}} \times 100 \text{ (equação 1)}$$



Figura 5: (A) Cascas congeladas; (B) cascas em estufa de circulação de ar à $50 \pm 5^\circ\text{C}$; (C) cascas desidratadas; (D) Cascas em moinho de facas; (E) Pó da casca em peneiras de granulometria; (F) Pó da casca suspenso em água destilada; (G) Suspensão coada em papel filtro; (H) peso da placa vazia; (I) peso da placa com o extrato seco; (J) Extrato sólido; (K) Extrato líquido.

4.4 Método cromatográfico

4.4.1. Equipamento

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Shimadzu (Kyoto, Japão) acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-M20A e a um espectrômetro de massas com fonte de ionização *eletrospray* (ESI) no modo positivo e analisador tipo tempo de voo

MicrOTOF II (Bruker Daltonics, Alemanha). O equipamento é composto por uma bomba binária LC-20ADx, auto-injetor SIL-20AHT, loop de injeção de 100 µL, degaseificador DGU-20A3R, forno CTO-20A e interligados por uma interface CBM 20A. Os espectros de massas foram adquiridos na faixa m/z 50-1100. O nitrogênio foi usado como gás de secagem com taxa de fluxo de 9,0 L/min, e gás nebulizador à pressão de 2 Bar. A temperatura do nebulizador foi de 247 °C. O hélio foi utilizado como gás de colisão na pressão de 4×10^{-6} . Os cromatogramas e espectros de massas foram registrados pelo *software* DataAnalysis.

4.4.2. Condições analíticas para o perfil cromatográfico do EACPG e do método quantitativo

As amostras foram analisadas utilizando-se uma coluna analítica C₁₈ Shimpack XR-ODS (100 x 2,0 mm d.i., 5 µm). Utilizou-se uma vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 10 µL, temperatura do forno fixada em 30 °C e fase móvel constituída de solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila (ACN) com solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (B). As análises foram feitas utilizando-se o gradiente otimizado no modo reverso de 2-28% de B por 40 min ($\Delta\%B/min = 0,65$), permanecendo isocrático em 28% (B) por 5 min. O retorno do gradiente foi feito em 5 min (28-2% de B). A coluna foi condicionada em 2% de B por 10 min entre cada análise.

Os cromatogramas foram registrados com detector de arranjo de diodos em varredura de 190-800 nm e todos os perfis cromatográficos por CLAE foram obtidos na absorção de 280 nm. Os picos referentes ao ácido gálico e ácido elágico foram determinadas pelo tempo de retenção obtido com a análise da solução do padrão e a pureza do pico foi assegurada pela análise de amostras de extratos.

4.5 Identificação e quantificação dos marcadores químicos no EACPG

O ácido gálico e o ácido elágico foram identificados no EACPG com base em seus tempos de retenção (t_R), coinjeção das amostras com padrões, comparação dos seus espectros de UV ($\lambda = 280$ nm), obtidos pelo detector de arranjo de diodos, e dos seus espectros de massas, com dados publicados na literatura. Para a quantificação, utilizou-se a curva analítica por padrão externo (item 5.5.1.2.) dos ácidos fenólicos, após validação do método cromatográfico.

4.5.1. Linearidade

4.5.1.1. Preparo das soluções

As soluções estoque do ácido gálico (Sigma, $\geq 95\%$) e do ácido elágico (Sigma, $\geq 95\%$) foram preparadas em uma concentração de 0,5 mg/mL, em balão volumétrico de 50 mL. O ácido gálico foi dissolvido em metanol grau CLAE e o ácido elágico foi submetido por 1h em ultrassom em água ultrapura.

O EACPG foi preparado em metanol grau CLAE, em uma concentração de 0,5 mg/mL, em balão volumétrico de 5 mL, em triplicata.

As amostras foram filtradas em filtro de membrana de 0,45 μm antes das análises no CLAE.

4.5.1.2. Curva de calibração por padrão externo

As soluções-padrão do ácido gálico e do ácido elágico foram preparadas em triplicata, a partir das soluções estoque, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido gálico e 1, 4, 8, 12 e 16 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido elágico. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras. Como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão, foi considerado um coeficiente de correlação maior que 0,9900.

4.5.2. Seletividade e efeito da matriz

A seletividade e o efeito da matriz foram avaliadas através do método de adição de padrão. O EACPG (0,0025 g) foi fortificado com as soluções-padrão do ácido gálico, nas concentrações de 0,5, 1, 2, 4 e 6 $\mu\text{g/mL}$, e com as soluções-padrão do ácido elágico, nas concentrações de 1, 4, 8, 12 e 16 $\mu\text{g/mL}$, preparados em triplicata, de forma a reproduzir os pontos da curva de calibração por padrão externo. Após 24 h, cada amostra da curva de calibração do ácido gálico foi solubilizada em metanol e as amostras do ácido elágico em água ultrapura, em balão volumétrico de 5 mL. As curvas de calibração foram obtidas por regressão linear, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras.

4.5.3. Exatidão

A exatidão foi determinada por meio de ensaios de recuperação utilizando o EACPG. O extrato foi fortificado por 24h com as soluções-padrão do ácido gálico, nas concentrações de 0,5, 2 e 6 $\mu\text{g/mL}$, e com as soluções- padrão do ácido elágico, nas concentrações de 1, 8

e 16 µg/mL, correspondentes a três níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta), respectivamente, em triplicata. A recuperação foi determinada considerando os resultados obtidos para cada analito estudado, utilizando a seguinte equação matemática:

$$\% \text{ Recuperação} = [(\text{concentração medida}) / (\text{concentração esperada})] \times 100$$

4.5.4. Precisão

4.5.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada através da análise, em triplicata, das soluções-padrão do ácido gálico nas concentrações de 0,5, 2 e 6 µg/mL e das soluções-padrão do ácido elágico nas concentrações de 1, 8 e 16 µg/mL. Todas as soluções-padrão foram submetidas a três diferentes preparações, no mesmo dia e pelo mesmo analista, sendo, então, estimado o coeficiente de variação (CV) correspondente a cada nível de concentração.

4.5.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada realizando-se análises em triplicata, em dois dias não consecutivos, por analistas diferentes, das soluções-padrão do ácido gálico nas concentrações de 0,5, 2 e 6 µg/mL e das soluções-padrão do ácido elágico nas concentrações de 1, 8 e 16 µg/mL, correspondentes a três níveis diferentes de concentração (baixa, média e alta), respectivamente. O coeficiente de variação (CV) foi estimado ao final das sucessivas repetições.

4.5.5. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção (LD) foi determinado através dos parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte equação:

$LD = 3,3 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

4.5.6. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) foi determinado através dos parâmetros relativos a cada curva analítica construída, utilizando a seguinte equação:

$LD = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

4.6 Ensaio biológico

5.6.1 Animais

Foram utilizados 40 ratos Wistar, fêmeas, provenientes do Biotério da Universidade Tiradentes, com idade entre 2 e 3 meses, pesando entre 250 a 300 g. Os animais foram mantidos em número de quatro, em caixa retangular, com maravalha, identificadas, em regime de ciclo de luz de 12 h em temperatura controlada (20 a 22 °C) e receberam ração padrão Labina® e água *ad libitum*.

4.6.2 Grupos Experimentais e tratamentos

Após a realização de um pré-teste funcional através da escala de avaliação locomotora de BASSO, BEATTIE e BRESNAHAN (BBB) (1995; 1996). Os animais foram alocados em grupos conforme ilustrado no quadro 2 e figura 6.

Grupo s (n=8)	Procedimento cirúrgico	Tratamento
(Lam)	Falso-operado	Veículo (água) por via oral 1 ML
Hemissecção/veículo	Hemissecção em nível torácico	Veículo
Hemissecção/EACPG1 00	Hemissecção em nível torácico	EACPG por via oral 100 mg/kg
Hemissecção/EACPG3 00	Hemissecção em nível torácico	EAPG por via oral 300 mg/kg
Hemissecção/Metil	Hemissecção em nível torácico	Metilprednisolona 30 mg/kg por via

Quadro 2: Disitribuição dos grupos experimentais. Eutanásia em 28 dias.

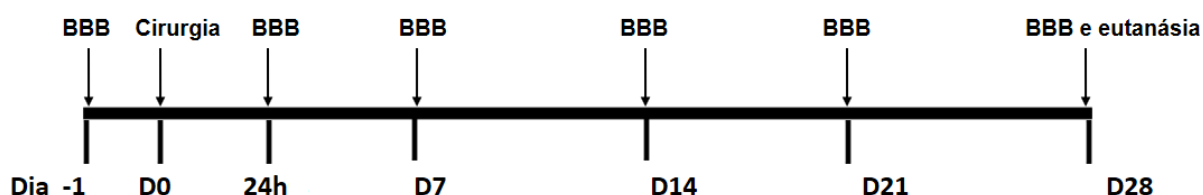


FIGURA 6: Cronologia do desenho experimental *in vivo* ao longo dos 28 dias. Dia -1: dia em que foi realizado o pré-teste para avaliar inicialmente o estado dos animais. D0 dia da cirurgia, 24 h, D7, D14, D21, D28 referem-se ao primeiro, sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dia pós-operatório. BBB: escala de avaliação locomotora de BASSO, BEATTIE e BRESNAHAN (1995). Os tratamentos foram administrados diariamente no período de 28 dias.

4.6.3 Tratamentos

Extrato aquoso de *P. granatum*

Os EACPG 100 mg/kg (AHMED *et al.*, 2014a) e 300 mg/kg foram previamente preparados e adicionados à água destilada de maneira que as doses estivessem contidas e

1mL (volume administrado para o animal). As doses deste tratamento foram administradas diariamente por meio de gavagem, via oral.

Veículo

Como veículo utilizou-se 1mL de água destilada também administrado por via oral (gavagem) diariamente.

Metilprednisolona

A Metilprednisolona foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) da seguinte forma: 30mg/kg, 1h após a cirurgia e 5,4 mg/kg 23h após a lesão (ÇAVOS *et al.*, 2013).

4.7 Procedimentos cirúrgicos de laminectomia e lesão medular

Os ratos foram pesados e anestesiados com uma mistura de ketamina (75 mg/kg) e xilazina (14 mg/kg) administradas por via intraperitoneal. Em seguida, foram realizadas a tricotomia, a assepsia com iodopovidina e a incisão na região dorsal da coluna torácica.

Após isso, os animais foram submetidos aos seguintes procedimentos:

Laminectomia: A musculatura foi divulsionada, expondo as vértebras T8 – T11, identificadas pela palpação das apófises espinhosas. Após a identificação das vértebras, a apófise espinhosa e a lâmina da vértebra T10 foram cuidadosamente retiradas, usando-se uma lupa cirúrgica com aumento de 10x (WANG *et al.*, 2017).

Lesão Medular: Inicialmente, os mesmos procedimentos descritos para a laminectomia foram executados. Em seguida, os animais do grupo lesão foram submetidos à hemiseção do lado direito da medula utilizando microtesoura e bisturi (KUSHCHAYEV, 2016).

Ao término destes procedimentos, a musculatura dos animais foi suturada com 2 pontos (laçada dupla). Após isso, a mesma foi recoberta pelo tecido adiposo para que a sutura da pele fosse realizada. Animais do grupo Lam foram submetidos à cirurgia, porém sem os procedimentos de laminectomia e hemiseção medular.

Os animais foram acomodados em sala climatizada para recuperação pós-cirúrgica no intuito de monitorar as condições de alimentação, hidratação, excreção de fezes e urina. Ao fim dos procedimentos, os animais receberam massagens abdominais 3 vezes ao dia para que houvesse a restauração das condições normais de diurese e dejeção.

Foi utilizado como medicamento pós-cirúrgico o Pencivet Plus PPU composto pelas substâncias benzilpenicilinas G, benzantrina e procaína, Dihidroestreptomicina e Piroxicam que possuem efeito antibiótico, anti-inflamatório e analgésico (ANDRADE *et al.*, 2014).

4.8 Avaliação da Função sensório-motora

A avaliação funcional foi realizada no pré-operatório (1 dia antes), nas primeiras 24 h e nos dias 7, 14, 21 e 28 por meio da aplicação da escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (1995; 1996) constituída de 0 a 21 pontos. A avaliação foi realizada por meio da observação de parâmetros comportamentais, por dois observadores

sendo que um deles desconhecia os grupos e tratamentos. Portanto, enquanto os animais se locomoviam (durante 4 minutos), foram analisados os seguintes parâmetros: movimento do membro, posição da pata, tipo de passo, coordenação da passada, abertura dos dedos, rotação predominante da pata, estabilidade do tronco e posição da cauda.

Os pontos refletem a condição motora, onde zero representa paralisia total do membro e 21 pontos representa função motora normal do membro. Pontuações entre 0 e 7 indicam o retorno de movimentos isolados de até três articulações (quadril, joelho e tornozelo). Pontuações entre 8 e 13 indicam o retorno dos passos plantares e coordenação dos movimentos entre patas posteriores e anteriores. Por fim, pontuações entre 14 e 21 mostram o retorno da abertura dos dedos durante a passada, posição predominante da pata em paralelo ao tronco, estabilidade de tronco e levantamento da cauda (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995).

4.9 Avaliação Histológica

Aos 28 dias os animais foram eutanasiados para análise histológica. O tecido medular em torno da área cirúrgica (2 cm) foi retirado e conservado em formalina por um período de sete dias. O material será então desidratado em série alcoólica crescente, diafanizado em série de xilóis e incluído em parafina sob forma de blocos que serão levados ao micrótomo, para fornecer os cortes transversais de 5 µm.

Serão coletadas ao menos 2 cm correspondentes à área da medula torácica. As modificações histológicas decorrentes da hemisseção e da sua associação com os tratamentos serão analisadas por meio da coloração de hematoxilina-eosina (HE, EMERY *et al.*, 1998; WADA *et al.*, 1999). A técnica da coloração consiste em manter as seções de tecido em contato com a hematoxilina de Harris por 90 s, lavar em água corrente por 5 min, submergir em solução de água amoniacal, por 15 s, lavar em água corrente por 5 min e corar com a solução de Eosina por 30 s. A seguir as lâminas serão desidratadas e submetidas a uma bateria de álcoois em concentração crescente, a uma mistura de álcool e xilol e a xilol puro (3 min cada) para então serem montadas com lamínulas. Por meio desta coloração serão avaliados os aspectos estruturais e o perfil das alterações inflamatórias.

As quantificações serão realizadas por meio de análise de imagens utilizando microscópio Olympus CX31 acoplado à câmera fotográfica Olympus. Para que a análise histológica seja realizada às cegas quanto ao grupo experimental, os códigos de identificação de cada lâmina serão cobertos por outro experimentador antes do início da análise e revelados após o término.

A densidade de células marcadas para HE será medida na medula espinal, 2 cm ao redor do epicentro da lesão, bilateralmente nos cornos dorsal e ventral da medula dos animais.

As regiões serão identificadas de acordo com ilustrações apresentadas por Paxinos e Watson (1998). Para esta análise, serão observadas todas as secções colhidas para cada conjunto de lâminas correspondente às regiões rostral, central e caudal. Os resultados serão expressos como média da densidade celular (número de células marcadas em cada corno) $\pm$ erro padrão da média (EPM), em cada segmento para os lados direito e esquerdo (TRUDRUNG *et al.*, 2000).

A extensão longitudinal total da lesão medular será estimada calculando-se a distância entre a primeira e a última secção contendo sinais de lesão (KIGERL; MCGAUGHY; POPOVICH, 2006), através da coloração para HE. Os seguintes sinais de lesão serão considerados para o cálculo: hemorragia, cavitação, áreas de hipercelularidade, fragmentação tecidual ou arquitetura anormal do tecido, desorganização da substância cinzenta ou branca e oclusão moderada ou severa do canal central (KIGERL; MCGAUGHY; POPOVICH, 2006).

Para análise das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório, serão analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os critérios de intensidade e tipo do infiltrado inflamatório e hiperemia. Para análise das características histomorfológicas associadas ao processo inflamatório, foram analisadas as secções histológicas coradas em HE, observando-se os critérios de intensidade e tipo do infiltrado inflamatório e hiperemia. A reação inflamatória foi determinada quando à intensidade da reação, foram atribuídos escores de 0 a 3, de acordo com o seguinte padrão:

- 0 – Ausência do infiltrado inflamatório;
- 1 (grau leve) – O infiltrado inflamatório/hiperemia pode ser observado em menos de 10% do tecido medular;
- 2 (grau moderado) – Presença de infiltrado/hiperemia em 10 a 50 % do tecido;
- 3 (grau severo) – O infiltrado inflamatório/hiperemia ocorre em mais de 50% do tecido Medular.

4.10 Análise estatística

Com relação aos testes de comportamento já realizados, as amostras foram submetidas à análise de variâncias múltiplas com medidas repetitivas (MANOVA), sendo consideradas as variáveis tratamento e tempo, seguida do pós-teste de Bonferroni. Para a avaliação dos dados histológicos, as amostras que atenderem ao pressuposto de normalidade serão seguidas de análise de variância de duas vias (two way ANOVA), ambas seguidas do pós-teste de Bonferroni. Já a correlação entre o desempenho comportamental em 28 dias e os resultados obtidos para a marcação de neurofilamento será utilizado o teste de correlação de Pearson. As diferenças serão consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. Foi

utilizado o programa SPSS versão 19.0 Graph Pad Prism versão 5.0.

5. RESULTADOS

5.1 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas por CLAE-DAD foram otimizadas para se obter um perfil cromatográfico representativo dos múltiplos compostos presentes na amostra vegetal. A otimização consiste numa complexa avaliação de diferentes fatores que interferem simultaneamente na eficiência da separação, e podem interagir entre si.

Neste trabalho, foi avaliada a influência dos seguintes fatores sobre as condições cromatográficas de separação: parâmetros de eluição gradiente, composição da fase móvel, vazão e volume de injeção. As otimizações estão apresentadas na Tabela 1.

O primeiro passo para a otimização cromatográfica no modo reverso foi a utilização de um gradiente exploratório, em condições de ampla faixa de força de fase móvel, para visualizar a complexidade da amostra e identificar a fase móvel mais eficiente para separação dos componentes (SNYDER; DOLAN, 1996).

Para isso, foi utilizado como solventes uma mistura de ACN (B) e água (A), com intervalo de 5-100% (B) por 60 min, em uma coluna C₁₈ ShimPack XR-ODS (100 x 2,0 mm, 5 µm), com vazão de 1 mL/min, acompanhado pelo detector de arranjo de diodos com seleção da faixa de comprimento de onda entre 190-800 nm na região do UV para se fazer a determinação das absorvâncias das substâncias presentes na amostra (Figura 7). A ACN na fase móvel geralmente é menos viscosa e permite a utilização de valores baixos de comprimento de onda no UV para a detecção das substâncias.

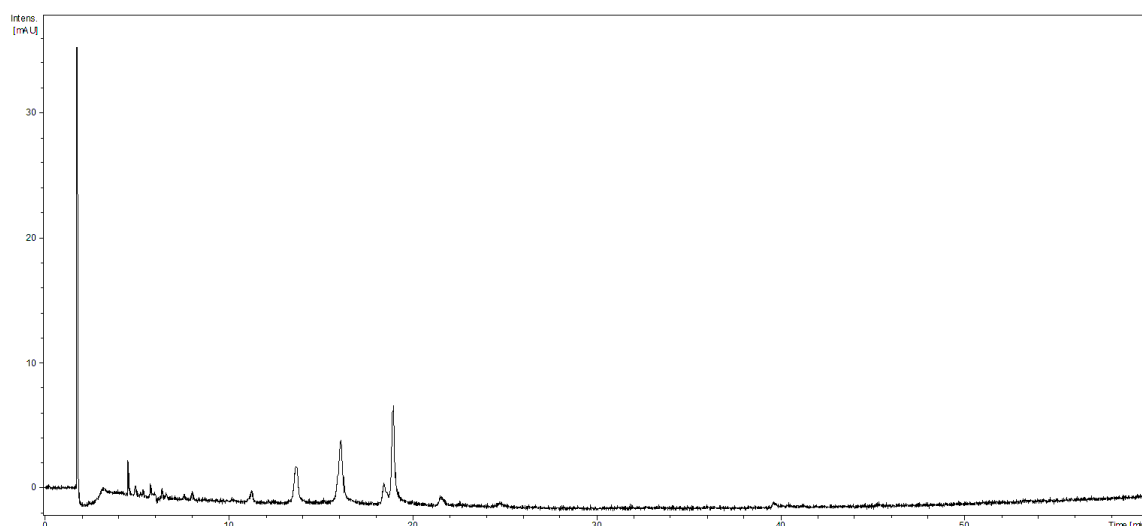


Figura 7- Cromatograma da condição cromatográfica 1: gradiente linear de 5-100% de ACN (B) em 60 min, vazão 1mL/min, $\lambda=280$ nm, $V_{inj.} = 10\mu\text{L}$.

Tabela 1: Condições cromatográficas avaliadas para análise do EACPG.

Fase estacionária	Análise	Condições cromatográficas
C₁₈ Shim-Pack XR-ODS (100 x 2,0 mm, 5 µm)	1	5-100% ACN: água por 60 min ($\Delta\%B/min = 1,58$); vol. inj. 10µL; vazão = 1,0mL/min; T= 30°C.
	2	2-32% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 20 min ($\Delta\%B/min = 1,5$); 32-80% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 30 min ($\Delta\%B/min = 1,6$); vol. inj. 20µL; vazão = 1,0mL/min; T= 30°C.
	3	2-23% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 15 min ($\Delta\%B/min = 1,4$); 23-32% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 6 min ($\Delta\%B/min = 1,5$); 32-80% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 25 min ($\Delta\%B/min = 1,9$); vol. inj. 20µL; vazão = 1,0mL/min; T= 30°C.
	4	2-32% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 30 min ($\Delta\%B/min = 1$); 32-80% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% ($\Delta\%B/min = 1,6$) por 30 min; vol. inj. 20µL; vazão = 1,0mL/min; T= 30°C.
	5	2-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 35 min; ($\Delta\%B/min = 0,74$); vol. inj. 20µL; vazão = 1,0 mL/min; T= 30°C.
	6	5-26% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 35 min; ($\Delta\%B/min = 0,6$); vol. inj. 20µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30°C.
	7	8-30% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 30 min; ($\Delta\%B/min = 0,73$); vol. inj. 20µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30°C.
	8	2-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 40 min; ($\Delta\%B/min = 0,65$); vol. inj. 10µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30°C.
	9	2-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 40 min; ($\Delta\%B/min = 0,65$); 28% por 5 min; vol. inj. 10µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30°C.
	10	8-28% ACN com ácido fórmico 0,1%: ácido fórmico 0,1% por 40 min; ($\Delta\%B/min = 0,5$); vol. inj. 10µL; vazão = 0,5 mL/min; T= 30°C.

A análise cromatográfica da condição 1 permitiu verificar que as substâncias presentes na amostra apresentaram baixa interação com a fase estacionária, além disso não foi possível obter uma adequada separação dos picos.

A partir dessa primeira análise foi possível determinar as próximas condições experimentais de separação, utilizando a relação entre o intervalo de variação da concentração do modificador orgânico ($\Delta\%B$) e o tempo de análise (tg) obtendo-se o valor da inclinação do gradiente ($\Delta\%B/min$). Esta medida é usada para descrever mudanças na separação decorrentes do aumento ou diminuição na inclinação do gradiente (CASS;

DEGANI, 2001).

Como no EACPG é comum a presença de compostos fenólicos diversos, a fase estacionária quimicamente ligada ao grupo octadecilsilano (C_{18}) e a solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) na composição da fase móvel foram escolhidas nas análises cromatográficas. Na fase estacionária C_{18} devido a sua baixa polaridade ocorrem interações hidrofóbicas entre a parte não polar das substâncias a serem separadas e as cadeias hidrocarbônicas da fase estacionária. A solução ácida na composição da fase móvel teve como intuito melhorar a retenção e resolução das substâncias presentes no extrato através da supressão da ionização, pois as tornam mais hidrofóbicas, aumentando a sua retenção.

Dentre as condições analíticas avaliadas, o cromatograma que mostrou melhor faixa de retenção e melhor separação foi obtido com a condição cromatográfica 9 da tabela 1: coluna analítica de fase estacionária C_{18} Shimpack XR-ODS (100 x 2,0 mm d.i., 5 μ m), utilizando vazão de 0,5 mL/min, volume de injeção de 10 μ L e eluição gradiente no modo reverso, com fase móvel constituída por solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (A) e acetonitrila com solução de ácido fórmico 0,1% (v/v) (B), com seguinte inclinação: 2-28% de B em 40 min ($\Delta\%B/min = 0,65$), permanecendo isocrático em 28% (B) por 5 min; o retorno do gradiente de 28-2% (B) por 5 min, apresentado na Figura 9. Esta condição foi definida como a condição analítica para a validação do método e posterior quantificação das substâncias de interesse.

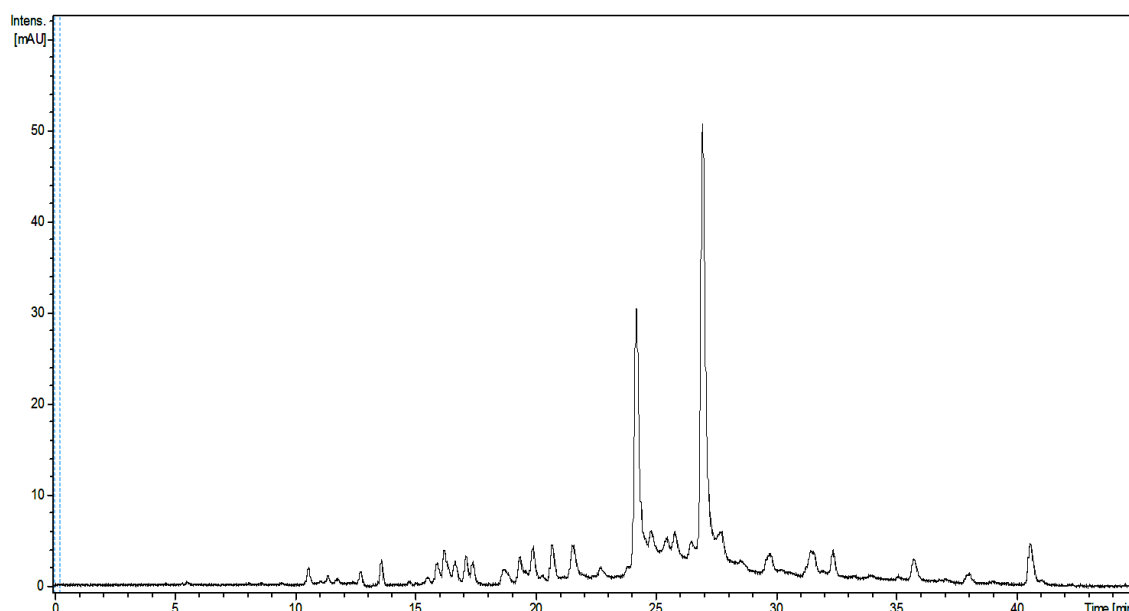


Figura 8: Cromatograma ($\lambda = 280$ nm) de eluição gradiente do EACPG, referente à condição 9 da Tabela 1.

5.2 Identificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico por CLAE-DAD-ESI/MS

No extrato de *P. granatum* foram identificados os marcadores químicos ácido gálico e

ácido elágico por CLAE-DAD-ESI/MS. A Figura 9 apresenta o perfil cromatográfico do extrato de *P. granatum*, onde estão assinalados os picos referente a cada substância. Os picos com tempo de retenção (t_r) de 15,9 e 40,5 min, correspondem ao ácido gálico e ácido elágico, respectivamente.

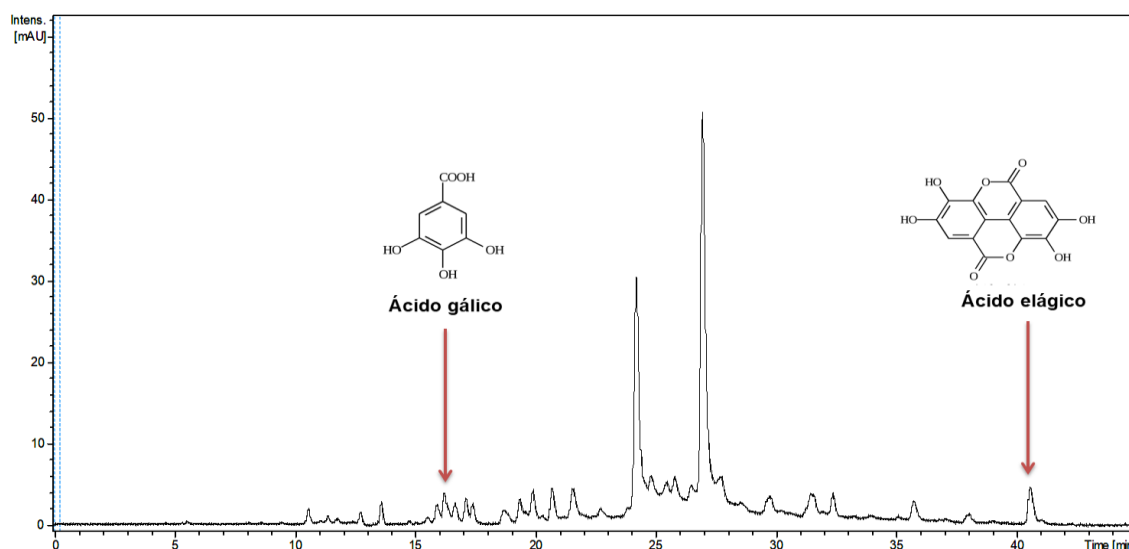


FIGURA 9: Perfil cromatográfico do EACPG . Ácido gálico ($t_r = 15,9$ min) e ácido elágico ($t_r = 40,5$ min).

O espectro de massas do ácido gálico ($t_r = 15,9$ min) exibiu o íon molecular protonado $[M+H]^+$ em m/z 171, indicando a fórmula molecular $C_7H_6O_5$ (Figura 10-A). O ácido elágico com t_r de 40,5 min apresentou íon molecular protonado $[M-H]^+$ em m/z 303, de fórmula molecular $C_{14}H_6O_8$ (Figura 10-B).

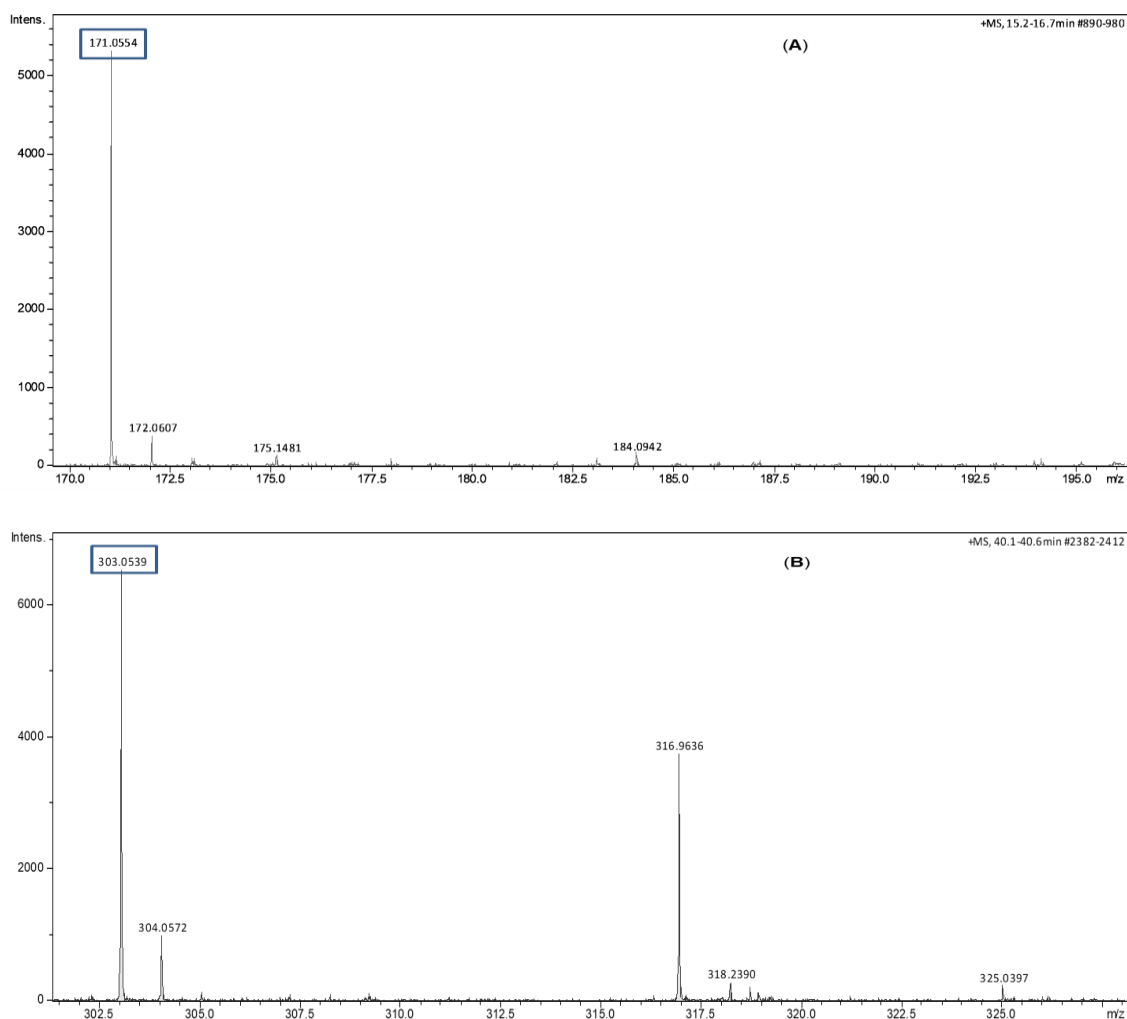


Figura 10: ESI(+)-MS ampliado do EACPG. $[M+H]^+$ em m/z 171 – ácido gálico (A) e $[M+H]^+$ em m/z 303 – ácido elágico.

5.2.1. Linearidade

A linearidade é a resposta obtida em função da capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância a ser analisada, dentro de uma faixa de aplicação (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

Por meio da construção das curvas analíticas, é possível avaliar a linearidade do método pela estimativa dos coeficientes de correlação referentes às equações das curvas, obtidas por regressão linear. O gráfico da curva de calibração deve ser construído com no mínimo cinco valores de concentração, representado por uma reta, que relaciona a resposta do equipamento com as várias concentrações das substâncias em estudo (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

As curvas de calibração do ácido gálico e do ácido elágico foram construídas pelo método de padronização externa a partir do preparo e análise de cinco concentrações, em triplicata, e a regressão foi obtida pelo método dos mínimos quadrados, a partir da relação entre as áreas dos picos e as concentrações das amostras.

As curvas de calibração obtidas estão apresentadas na Figura 11. Os coeficientes de correlação obtidos na padronização externa foram respectivamente 0,9983 e 0,9962, para ácido gálico e ácido elágico, mostrando a forte correlação linear entre a concentração das substâncias analisados e as áreas dos picos, com valores acima de 0,99, conforme preconizado pela Anvisa (BRASIL, 2017). Desta forma, o método cromatográfico é linear para a quantificação dos analitos na faixa de concentração avaliada.

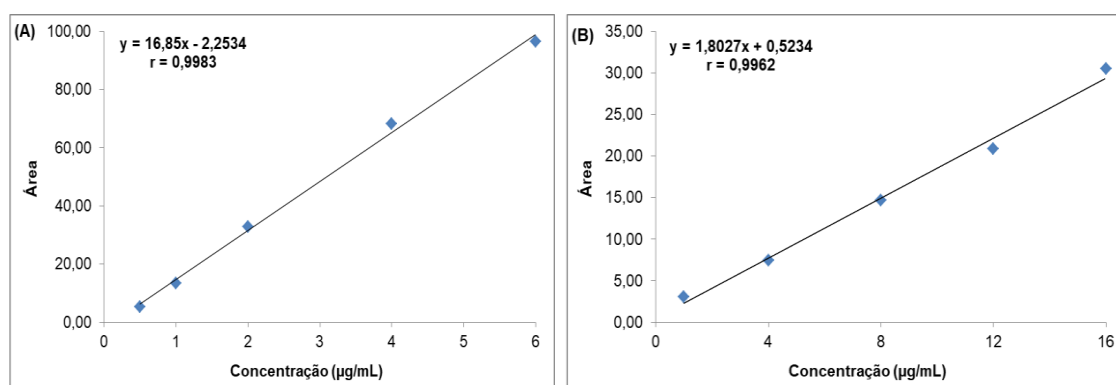


Figura 11: Curvas de calibração por padronização externa para o método de quantificação de ácido gálico (A) e ácido elágico (B).

5.2.2 Seletividade e efeito da matriz

Seletividade é a capacidade de avaliar, de maneira inequívoca, as substâncias em exame na presença de outros componentes como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente da substância de interesse (BRASIL, 2017). A seletividade pode ser avaliada pelo método de adição de padrão. Este método é usado quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância de interesse, como em matrizes complexas (RIBANI *et al.*, 2014). Neste caso, é feito duas curvas analíticas, uma com adição da substância de interesse na amostra e a outra sem a presença da matriz. Comparando-se então as duas curvas analíticas, caso elas sejam paralelas, pode-se dizer que o método tem seletividade e que a matriz não interfere na quantificação do analito de interesse.

As curvas de calibração obtidas estão apresentadas nas Figuras 12 e 13. Ao se observar as figuras, verifica-se que o método foi seletivo para a quantificação do ácido gálico e do ácido elágico, uma vez que as duas curvas são paralelas e os coeficientes angulares são bastante próximos entre si, o que demonstra a seletividade do método e a não-interferência da matriz na resposta analítica.

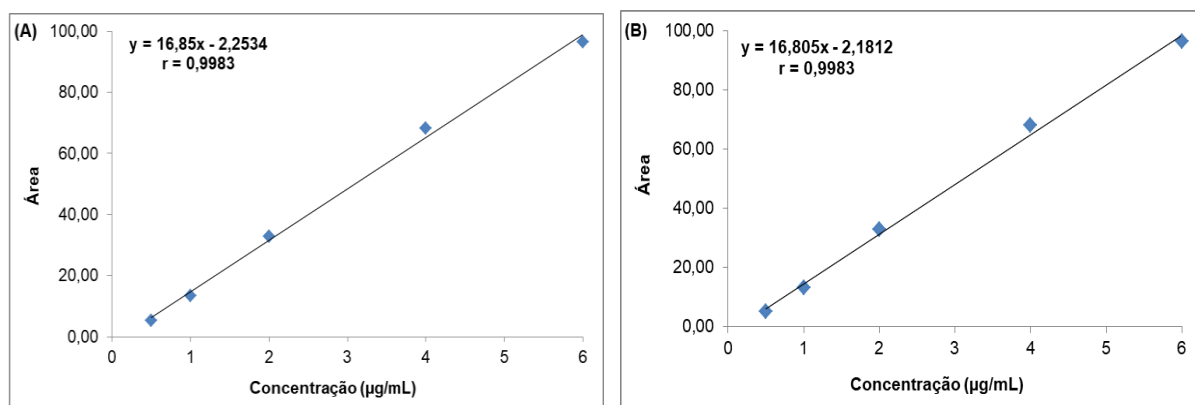


Figura 12- Curvas de calibração por padronização externa (A) e por adição de padrão (B) para o método de quantificação de ácido gálico no extrato de *P. granatum*.

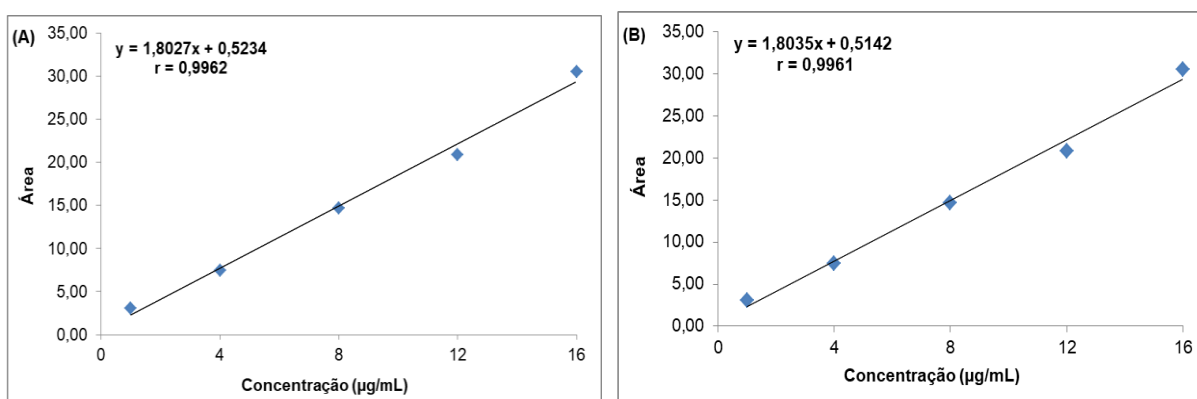


Figura 13- Curvas de calibração por padronização externa (A) e por adição de padrão (B) para o método de quantificação de ácido elágico no extrato de *P. granatum*.

5.2.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação (LQ) e o limite de detecção (LD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017). O LQ e o LD podem ser calculados pelo método visual, método da relação sinal-ruído e pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica construída. Neste estudo, a determinação dos limites de detecção e quantificação foi baseada em parâmetros da curva analítica do ácido gálico e ácido elágico, utilizando as seguintes equações: $LD = 3,3 \times (s/S)$ e $LQ = 10 \times (s/S)$, em que s é a estimativa do desvio-padrão da equação da linha de regressão e S é o coeficiente angular da curva analítica.

Os LD foram de 0,50 µg/mL e 2,01 µg/mL para o ácido gálico e ácido elágico, respectivamente. O LQ obtido para o ácido gálico foi de 1,51 µg/mL e 6,10 µg/mL para o ácido elágico.

5.2.4. Precisão

Representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma

mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI *et al.*, 2014; BRASIL, 2017).

A precisão foi avaliada de duas maneiras: repetibilidade e precisão intermediária. Os resultados obtidos foram expressos como desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) entre as áreas obtidas para as replicatas analisadas. O valor máximo aceitável de coeficiente de variação (CV) vai depender do método empregado, da concentração do analito na amostra, do tipo de matriz e da finalidade do método, porém, não deve ultrapassar 5%.

5.2.4.1. Repetibilidade

A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações e é, algumas vezes, denominada precisão intraensaio ou intracorrida (BRASIL, 2017).

Para a avaliação da repetitividade do método, foi realizada a análise de soluções-padrão, correspondentes a três níveis de concentração (baixa, média e alta), submetidas a três diferentes preparações, sendo, então, estimado o CV correspondente para cada nível de concentração.

A tabela 2 apresenta os valores obtidos de CV para a precisão do método quantitativo proposto. Constatou-se neste trabalho, em todos os testes realizados, que o método apresentou todos os valores dentro dos limites aceitáveis, indicando uma boa repetibilidade.

Tabela 2 - Média das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para cada substância na avaliação da repetibilidade do método.

Substância	Concentração (µg/mL)	Área (n=3)	CV (%)
Ácido gálico	0,5	5,24	2,65
	2,0	41,13	3,47
	6,0	96,59	4,47
Ácido elágico	1,0	1,41	4,49
	8,0	14,92	2,45
	16,0	30,02	3,14

5.2.4.2. Precisão intermediária

A precisão intermediária indica o efeito das variações da análise de uma mesma amostra, no mesmo laboratório, em pelo menos dois dias diferentes, realizada por diferentes analistas (BRASIL, 2017). O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que, no mesmo laboratório, o método fornecerá os mesmos resultados. Para isso, foi realizada a

análise, em 2 dias diferentes, por analistas diferentes, utilizando o mesmo equipamento, de soluções-padrão referentes a três níveis de concentração, sendo estimado o CV ao final das sucessivas repetições.

Como observado na Tabela 3, os valores de coeficiente de variação (CV) para a precisão intermediária do método de quantificação de ácido gálico e ácido elágico estão abaixo do limite de 5%, conforme é recomendado.

Tabela 3 - Média das áreas dos picos e coeficientes de variação (CV) obtidos para o ácido gálico e ácido elágico na avaliação da precisão intermediária do método.

Substância	Concentração (µg/mL)	1º dia CV (%)	2º dia CV (%)	Média CV(%)
Ácido gálico	0,5	1,36	2,16	1,76
	2,0	1,10	3,87	2,49
	6,0	4,70	1,68	3,19
Ácido elágico	1,0	0,84	1,44	1,14
	8,0	0,01	1,42	0,71
	16,0	2,36	0,19	1,28

5.2.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível (BRASIL, 2017).

Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: uso de materiais de referência certificada, comparação de método proposto com método de referência, ensaios de recuperação com matriz fortificada e adição de padrão.

Nesse estudo, a exatidão foi avaliada por meio de ensaios de recuperação utilizando o EACPG, sendo o extrato fortificado com padrões dos analitos em 3 níveis de concentrações diferentes (baixo, média e alto).

Os valores aceitáveis de recuperação para alguns tipos de análise estão geralmente entre 70 e 120%, com precisão de até $\pm 20\%$; porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, esse valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até $\pm 15\%$ (RIBANI *et al.*, 2014).

Na tabela 4, constam os resultados do ensaio de recuperação do método quantitativo proposto, expressos em termos de porcentagem de recuperação. Observou-se neste estudo, que o método apresentou boa recuperação para o ácido gálico e o ácido elágico nos três níveis de concentração e com valores de coeficiente de variação (CV) menores que 5%, ficando todos os valores dentro dos limites aceitáveis (entre 70 e 120%).

Tabela 4 – Recuperação dos padrões em EACPG.

Composto	Concentração (µg/mL)			Recuperação (%)	Média	CV (%)
	Amostra	Adicionado	Encontrado			
Ácido gálico	0,93	0,5	1,35	94,49	91,78	2,64
	0,93	0,5	1,28	89,82		
	0,93	0,5	1,30	91,02		
	0,93	2,0	2,59	88,61	91,46	4,78
	0,93	2,0	2,61	89,29		
	0,93	2,0	2,82	96,49		
	0,93	6,0	7,20	103,89	103,19	1,71
	0,93	6,0	7,01	101,18		
	0,93	6,0	7,24	104,49		
Ácido elágico	26,95	1,0	29,52	105,61	106,72	1,17
	26,95	1,0	30,21	108,07		
	26,95	1,0	29,76	106,47		
	26,95	8,0	38,07	108,94	109,53	1,06
	26,95	8,0	38,02	108,79		
	26,95	8,0	38,75	110,87		
	26,95	16,0	50,91	118,54	119,27	0,34
	26,95	16,0	51,35	119,56		
	26,95	16,0	51,10	118,98		

5.3. Quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico

O método cromatográfico validado foi aplicado na quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico no EACPG.

Para a quantificação dos ácidos fenólicos, a pureza dos picos de interesse foram avaliadas. Para isso, o EACPG (0,5 mg/mL) foi analisado, utilizando detector de arranjo de diodos com varredura entre 190-800 nm. Os picos referentes ao ácido gálico ($t_r = 15,9$ min, $k = 1,61$) e ao ácido elágico ($t_r = 40,5$ min, $k = 5,64$) foram determinadas pela comparação com a análise da solução-padrão. O cromatograma apresentou boa seletividade ($\alpha = 1,08$) para o ácido gálico em relação ao pico em $t_r = 16,7$ min ($k = 1,74$) e excelente resolução ($R_s = 1,78$); e boa seletividade ($\alpha = 1,08$) para o ácido elágico em relação ao pico em $t_r = 38,0$ min ($k = 5,23$) com excelente resolução ($R_s = 5,85$), não sendo detectado nenhum interferente na eluição de ambos ácidos fenólicos. Na quantificação, o comprimento de onda selecionado foi 280 nm.

Os ácidos fenólicos foram quantificados no EACPG através do método de padronização externa, utilizando-se as curvas analíticas construídas para os padrões. Na análise do EACPG a concentração média do ácido gálico foi de $4,36 \pm 0,01$ mg/g de extrato e $94,33 \pm 0,57$ mg/g de extrato para o ácido elágico.

5.4 Avaliação Locomotora

Neste estudo a recuperação funcional foi avaliada utilizando a escala de classificação locomotora da BBB (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995). A escala de BBB é a principal escala utilizada para quantificar a recuperação motora em ratos com LME, e segue estudos realizados pelos MASCIS (Multicenter Animal Spinal Cord Injury Study) (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995; 1996).

A avaliação dos dados na avaliação BBB por meio de análise de variâncias múltiplas de medidas repetitivas evidenciou interações significativas entre os fatores tratamento e tempo ($F_{16-136} = 19,86$, $p < 0,0001$). Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{4-136} = 138,18$, $p < 0,0001$) e entre os tempos ($F_{4-136} = 293,31$, $p < 0,0001$). Foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($F_{4-136} = 138,18$, $p < 0,0001$) e entre os tempos ($F_{4-136} = 293,31$, $p < 0,0001$). Desta forma, os escores da BBB aumentaram progressiva e continuamente durante período experimental, sugerindo melhora funcional ao longo do tempo. Corroborando estes achados, Mayer et al. (2008) afirmaram que lesões severas geralmente levam a incapacidades permanentes, enquanto que as lesões moderadas, como a hemissecção medular aplicada neste estudo, são seguidas por certo grau de recuperação funcional espontânea.

Em todos os tempos analisados, observou-se que os grupos lesionados, independente do tratamento preconizado, mostraram valores médios significativamente menores que o grupo LAM ($p < 0,001$). Estes dados sugerem que o modelo experimental adotado no presente estudo foi eficiente em produzir uma lesão medular, conforme também constatado em estudos prévios realizados por (BANG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2015).

Com 24 h após a cirurgia, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos lesionados, independente do tratamento ($p > 0,05$).

Aos 7 dias ($p < 0,0001$) os grupos tratados com EACPG a 100 ($p < 0,001$) e 300 mg/kg ($p < 0,01$), bem como o grupo que recebeu metilprednisolona ($p < 0,001$) apresentaram escores médios de BBB significativamente maiores que aqueles do grupo lesionado tratado com veículo. Quando realizadas as comparações entre os diferentes tratamentos, observou-se que o EACPG a 100 mg/kg ($p < 0,001$) e a metilprednisolona ($p < 0,05$) promoveram aumentos nos escores em comparação com o grupo tratado com EACPG a 300 mg/kg. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias dos grupos EACPG100 e Metil ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni).

Depois de 14 dias, os grupos tratados com EACPG a 100 ($p < 0,001$) e 300 mg/kg ($p < 0,001$), bem como o grupo que recebeu metilprednisolona ($p < 0,001$) apresentaram médias significativamente maiores que as do grupo lesionado tratado com veículo, porém o grupo

tratado com EACPG a 100 m/kg apresentou valores médios significativamente maiores que os outros dois tratamentos ($p < 0,05$ em ambos os casos, Lesão/EACPG 300 e Lesão/Metil, pós-teste de Bonferroni).

Em 21 dias, novamente, todos os demais tratamentos resultaram em aumento dos valores médios em relação ao grupo Lesão/Veículo ($p < 0,001$ comparado a Lesão/EACPG100; $p < 0,05$ em relação a Lesão/EACPG300 e Lesão/Metil). Não foram observadas diferenças entre os tratamentos a partir deste período ($p > 0,05$, pós-teste de Bonferroni).

Finalmente, em 28 dias, apenas nos grupos tratados com EACPG 100 mg/kg ($p < 0,001$) e com metilprednisolona ($p < 0,05$) observou-se aumento em relação ao grupo lesionado tratado com veículo (pós-teste de Bonferroni, figura 13).

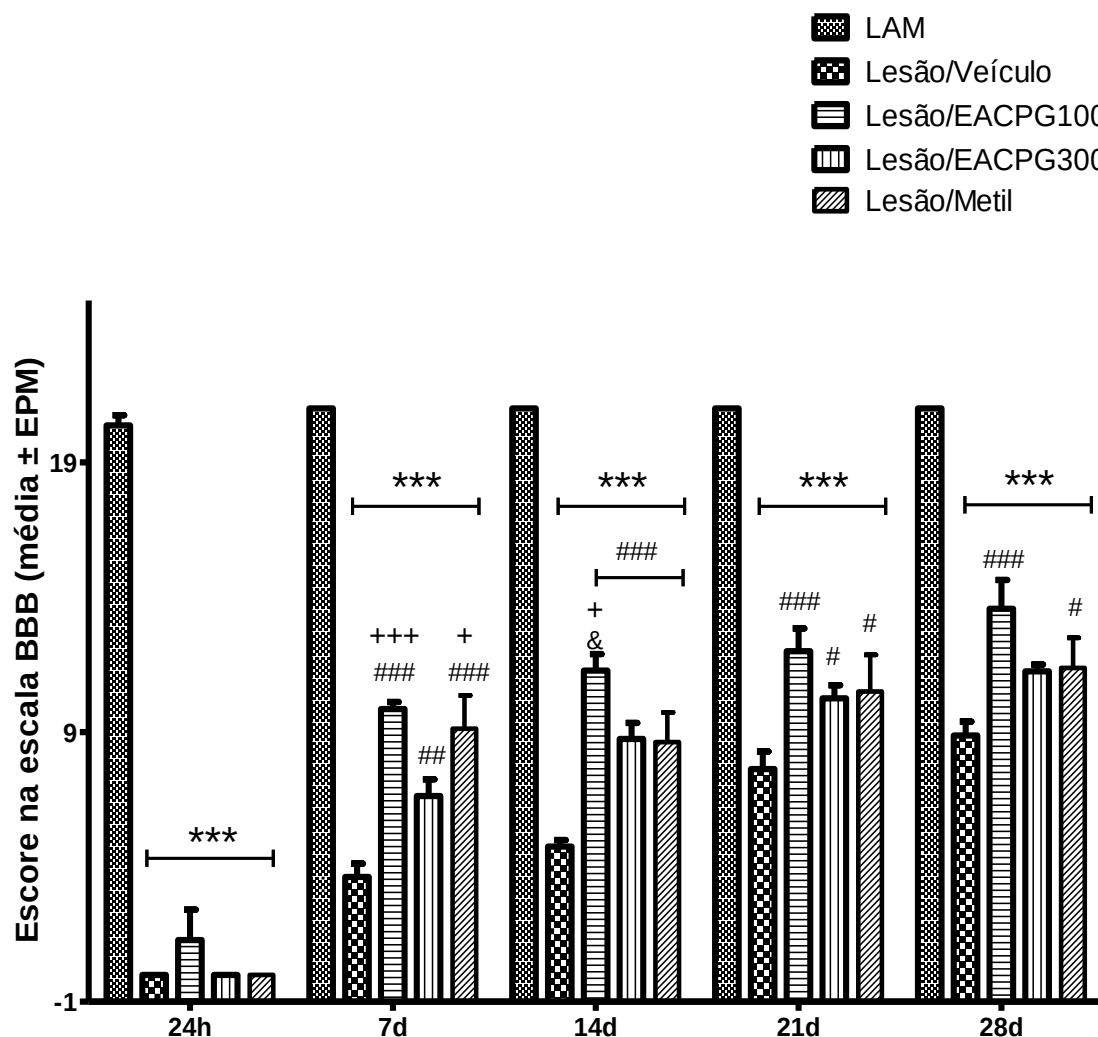


FIGURA 14: Resultados da avaliação comportamental por meio da escala de Basso, Beattie e Bresnahan. As colunas representam os escores médios e as barras representam o erro padrão da média. Os testes foram realizados aos 28 dias após as cirurgias. LAM: grupo laminectomia; LESÃO: grupo lesão/veículo; LESÃO/EACPG100: grupo lesionado e tratado com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* a 100 mg/kg; LESÃO/EACPG300: grupo lesionado e tratado com extrato aquoso da casca do fruto de *Punica granatum* a 300 mg/kg; Lesão/Metil: grupo lesionado e tratado com metilprednisolona a 30 mg/kg ($n = 8$ a 16 por grupo). *** indica valor de $p < 0,001$ em relação ao grupo LAM; # indica valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo LESÃO; ## indica valor de $p < 0,01$ em relação ao grupo LESÃO; ### indica valor de $p < 0,001$ em relação ao grupo LESÃO; + indica valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo EACPG300; +++ indica valor de $p < 0,001$ em relação ao grupo EACPG300; & indica valor de $p < 0,05$ em relação ao grupo Lesão/Metil (Análise de variância de duas vias, com medidas repetitivas e pós-teste de Bonferroni).

5.5 Avaliação Histológica

De modo geral, a análise das secções histológicas dos cornos anteriores da substância cinzenta revelou tecido medular exibindo características citomorfológicas compatíveis com normalidade, expressas pela presença de neurônios multipolares volumosos, esparsamente distribuídos, por vezes apresentando retração pericitoplasmática interpretada como alteração artefactual induzida pelo processo de fixação. De permeio, foram evidenciadas células da glia

redondas, ora bastante pequenas e com núcleos hipercromáticos (oligodendrócitos) ora um pouco maiores e com cromatina mais dispersa (astrócitos). Ocasionalmente células alongadas compatíveis com micróglia também foram notadas, assim como diminutos vasos sanguíneos estreitados, às vezes hiperemiados. Não foi observada diferença na arquitetura tissular ou no aspecto citomorfológico do tecido medular quando comparados os lados direito e esquerdo dos cornos anteriores dos diferentes grupos, excetuando no grupo veículo, onde pareceu haver menor celularidade no lado direito que no esquerdo. Em nenhum dos espécimes analisados foram observadas alterações degenerativas como atrofia, gliose, depósitos de hemossiderina ou calcificações distróficas, nem alterações inflamatórias (Figura 15).

Como demonstrado na Figura 16, a análise quantitativa do componente celular não mostrou qualquer diferença significativa no contingente de células da glia (astrócitos, oligodendrócitos e micróglia) entre os grupos analisados ($p > 0,05$). O mesmo comportamento foi evidenciado na análise quantitativa de neurônios, excetuando o grupo veículo, no qual o número médio destas células encontrado no lado direito foi significativamente menor que no lado esquerdo ($p < 0,05$).

Quando analisado o efeito dos diferentes tratamentos sobre o quantitativo de células nos cornos anteriores da medula espinhal (Figura 17), foi evidenciado que, no lado esquerdo (não lesado), não houve diferença entre os grupos seja em relação ao número médio de neurônios seja de células da glia ($p > 0,05$). Contudo, o número médio de neurônios no grupo veículo se mostrou significativamente menor que no grupo laminectomia ($p < 0,05$). Todos os demais grupos (EACPG100, EACPG300 e Metilprednisolona) apresentaram número médio de neurônios estatisticamente semelhantes ao grupo laminectomia ($p > 0,05$); porém EACPG100 e Metilprednisolona apresentaram quantitativo de neurônios significativamente maior que o grupo veículo ($p < 0,05$), o que não foi observado no grupo EACPG300 ($p > 0,05$). Além disso, apenas o grupo Veículo mostrou um número médio de células da glia maior que o grupo Laminectomia ($p < 0,05$). Os grupos EACP100 e Metilprednisolona exibiram número médio de células da glia significativamente menor que o grupo Véiculo ($p < 0,05$), mas não houve diferença entre este último e EACPG300 ($p > 0,05$).

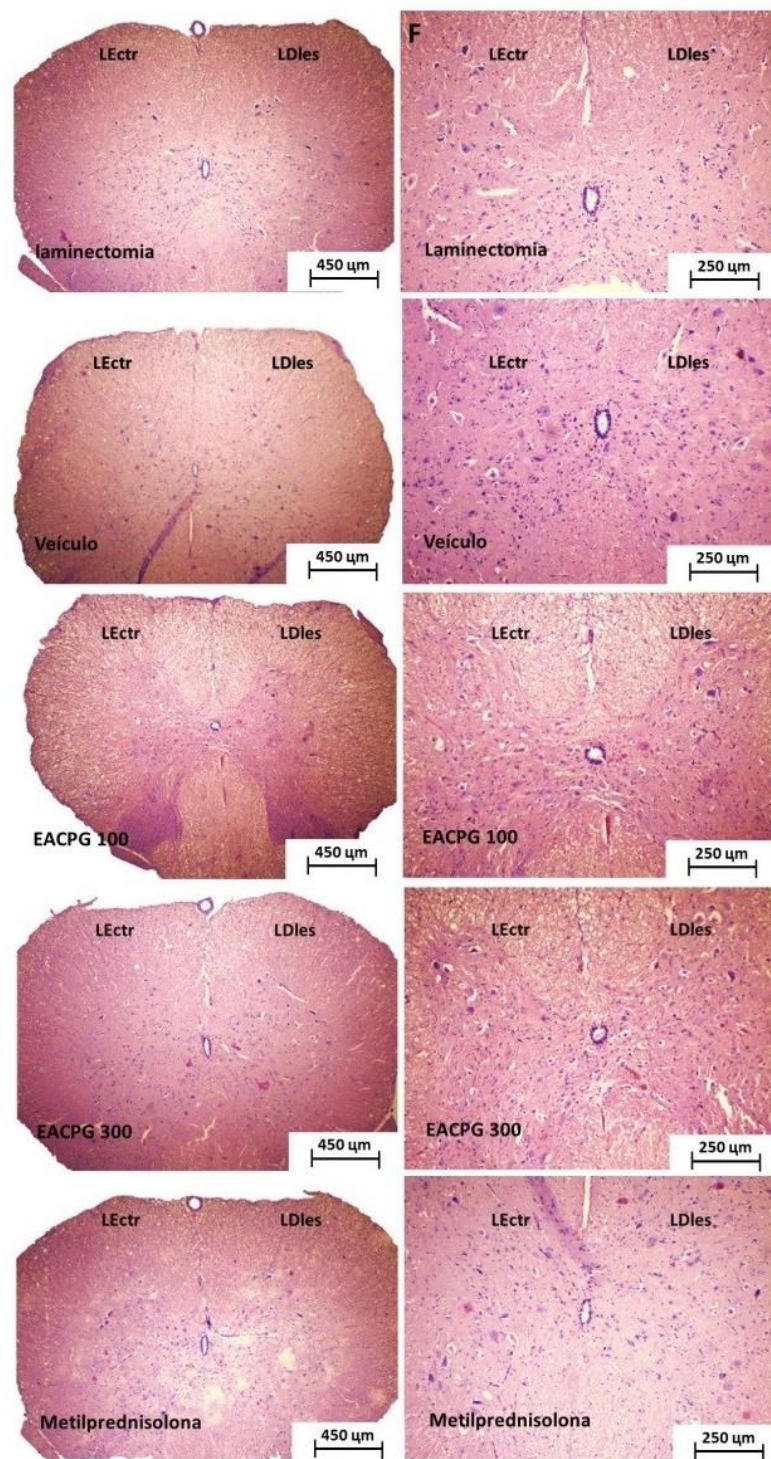


FIGURA 15: Fotomicrografias de secções histológicas coradas em HE representativas dos de tecido medular (magnificações de 100 × e 400 ×) dos diferentes grupos experimentais analisados demonstrando ausência aparente de reação inflamatória e gliose. **Legendas:** **LEctr** – lado esquerdo não lesado (controle interno) do corno anterior da medula; **LDles** – lado direito lesado do corno anterior da medula.

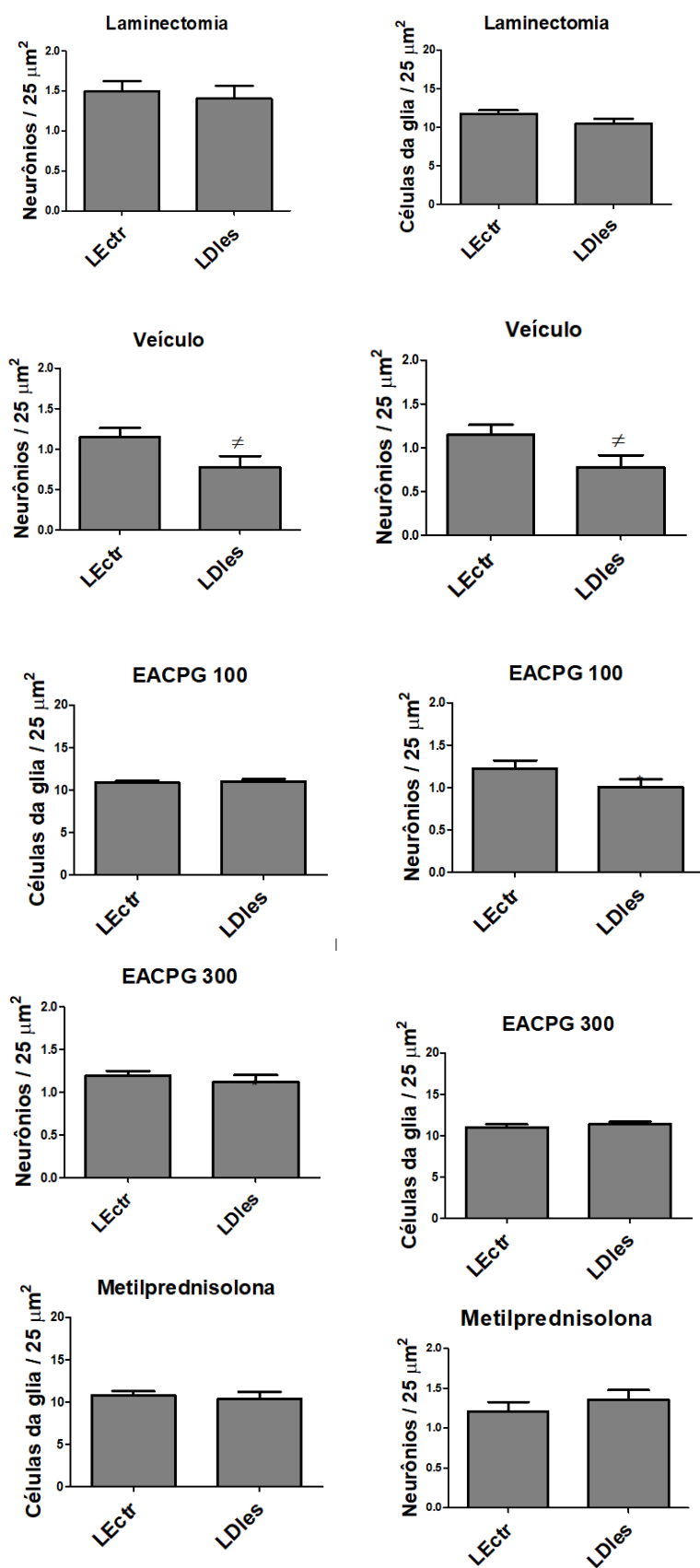


FIGURA 16: Análise quantitativa comparativa do número médio de neurônios e células da glia (por área equivalente a 25 μm^2) nos lados esquerdo (controle) e direito (lesado) do corno anterior medular em cada grupo experimental separadamente. **Diferença significativa entre lado direito e esquerdo:** ≠ $p < 0,05$.

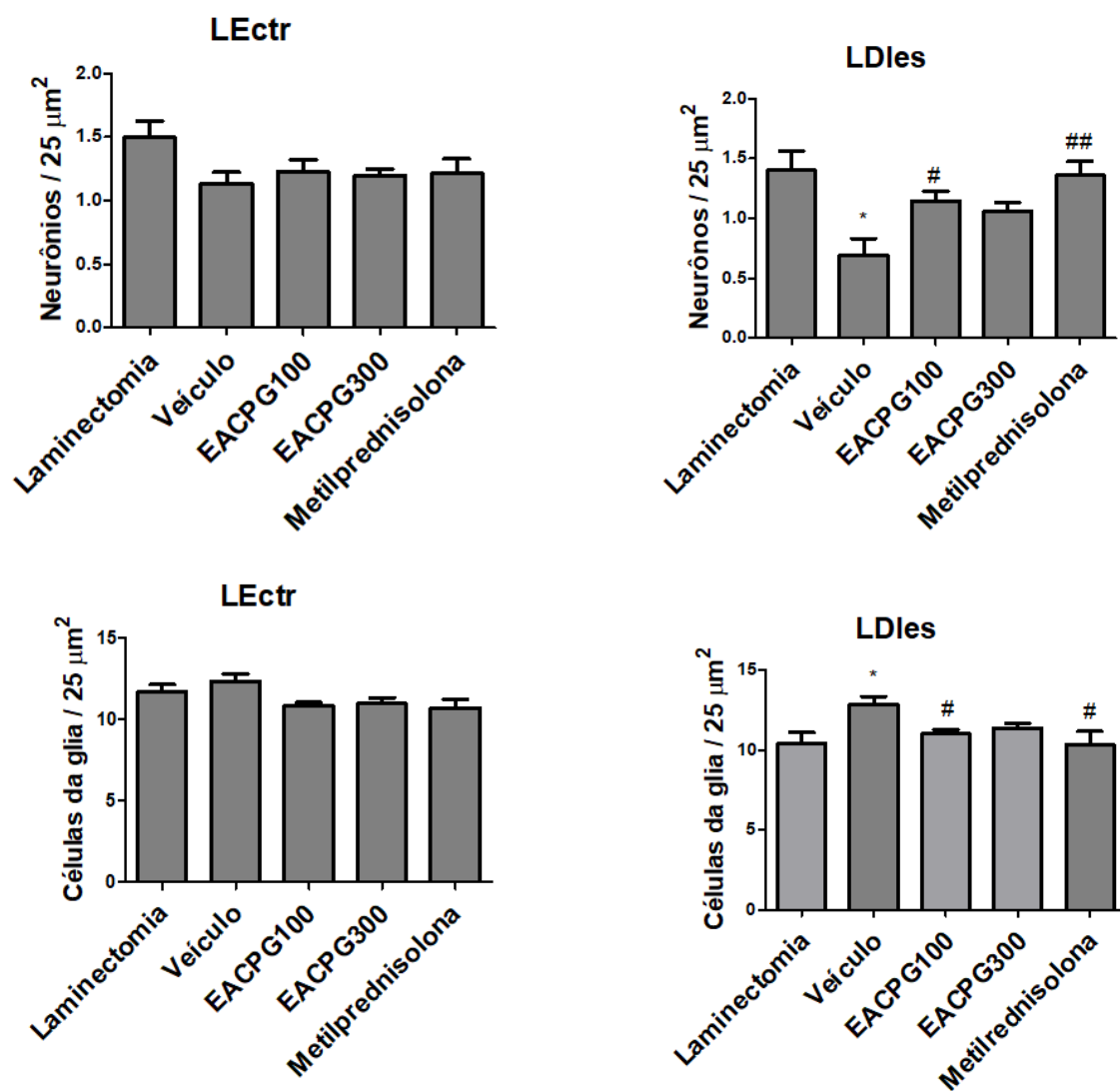


FIGURA 17: Análise quantitativa comparativa do número médio de neurônios e células da glia (por área equivalente a 25 μm^2) nos lados esquerdo (controle) e direito (lesado) do corno anterior medular entre os diferentes grupos experimentais. **Diferença significativa em relação ao grupo laminectomia:** * $p < 0,05$; **diferença significativa em relação ao grupo veículo:** # $p < 0,05$ (ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey).

6. DISCUSSÃO

Nesse estudo um novo método cromatográfico por CLAE-DAD-ESI/MS foi desenvolvido para identificação e quantificação dos marcadores químicos, ácido gálico e ácido elágico, presentes no EACPG, desta forma foi possível observar a presença destas substâncias na amostra utilizada nesse trabalho. Alguns estudos referem que tais compostos fenólicos são um dos componentes encontrados em maior concentração na casca de *P. granatum* (ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010; NASCIMENTO, 2013, KAZEMI *et al.*, 2016; ROSAS-BURGOS *et al.*, 2017). O EACPG, no presente trabalho, apresentou alta concentração dessas substâncias, o que assemelha-se aos achados de Ficher *et al.* (2011) e de Brighenti *et al.* (2017), que analisaram o extrato da casca do fruto de *P. granatum* e confirmaram por meio de CLAE-DAD/MS a presença desses compostos fenólicos, dentre eles o ácido gálico e o ácido elágico. A importância destes compostos para a presente proposta relaciona-se às suas ações já descritas para o sistema nervoso (ZAHIN; AQIL; AHMAD, 2010; KAZEMI *et al.*, 2016).

Estes dados são corroborados por estudos prévios, em modelo similar, realizados por Cho *et al.* (2011) e Johnson *et al.* (2012) LI *et al.* (2017), ao demonstrar que após o procedimento cirúrgico, nenhum dos ratos submetidos a hemisseção torácica, puderam movimentar a pata traseira do lado homolateral a lesão, enquanto o membro contralateral pôde mover-se normalmente. Conforme descrevem YU *et al.* (2012) tais resultados ocorreriam devido à limitação na capacidade de regeneração do SNC após uma lesão, o que justifica os dados obtidos no presente estudo.

Arvanian *et al.* (2009) realizaram avaliações separadas para os membros posteriores homolateral e contralateral a e observaram que a função no membro posterior homolateral, no mesmo período de tempo, atingiu escores médios da BBB semelhantes àqueles obtidos no presente estudo. Esses dados atestam que, apesar do aumento significativo nos escores médios da BBB, estes ainda foram considerados baixos e consistente com um quadro de lesão grave. O uso de EACPG, por outro lado, determinou melhoras significativas na atividade locomotora dos animais, comparáveis ao fármaco padrão utilizado para o tratamento de lesão medular (metilprednisolona).

No estudo de BenSaad *et al.* (2017) foi analisado o efeito da ação do ácido elágico, ácido gálico e a Punicalagina A e B, sobre a inflamação induzida sobre lipopolissacarídeos (LPS), óxido nítrico estimulado (ON), prostaglandina E2 (PGE-2), interleucina-6 (IL-6) e a liberação de ciclooxigenase-2 (COX-2). Os resultados mostraram que esses três compostos inibiram potencialmente a produção de ON, PGE-2 e IL-6 induzida por LPS e são os principais responsáveis pelo potencial anti-inflamatório da *P. granatum*.

No período de 14 a 21 dias após o trauma inicia-se a fase subaguda (ou intermediária). Essa fase é caracterizada pelo aumento dos fagócitos e proliferação ativa dos astrocitos,

resultando na formação de uma cicatriz glial que é considerada uma barreira crítica para a regeneração axonal tornando-se o principal limitante na regeneração do sistema nervoso central (KIM *et al.*, 2017).

Estudos clínicos demonstraram a eficácia do consumo de suco de romã para o estresse oxidativo (Muñoz *et al.*, 2016) e na prevenção de doenças relacionadas à inflamação (Shema *et al.*, 2012), câncer (Kapoor *et al.*, 2015) diabetes tipo 2 (Sohrab *et al.*, 2017), síndrome metabólica (Kojadinovic *et al.*, 2017) e obesidade (Muammar e Khan 2012).

Rojanathammanee *et al.* (2013) em seu estudo encontram que dentre os compostos presentes na *P. granatum* a Punicalagina destacou-se e seria o maior responsável pelo efeito neuroprotetor. Corroborando a estes achados Hartman *et al.* (2006); Choi *et al.* (2011) observaram resultados similares ao estudarem o efeito neuroprotetor da romã sobre a Doença de Alzheimer e encontraram uma melhora na recuperação do SNC.

Sámano (2017) em um estudo de revisão, pôde observar que o Metilprednisolona utilizado como forma de tratamento nas primeiras 24 h após LME, não tem efeitos tóxicos na recuperação da medula espinal. Contrapartida Zýková (2011) observou que o uso do Metilprednisolona em altas dosagens pode levar a efeitos adversos sérios, como sangramento gástrico, sepse, pneumonia, miopatia aguda de corticosteroides e infecção de feridas, o que pode auxiliar apenas nas modificações durante a recuperação neurológica. Os efeitos colaterais da terapia com Metilprednisolona como mencionado anteriormente podem estar relacionados à alta dosagem sistêmica e sua toxicidade (AHUJA, 2016).

Estes achados podem estar relacionados, com os danos gerados à medula espinal, que sofre uma sequência de alterações patológicas após lesões de origem traumática, como o surgimento de edema, hemorragia, necrose do tecido neuronal, desmielinização, formação de cistos e cavitações e, acarretam, dessa forma, comprometimento funcional significativo (Ramadam *et al.*, 2017). Esses achados são semelhantes com o de estudos anteriores que avaliaram os parâmetros locomotores e histomorfológicos do trauma medular em modelo roedor (AZIZ *et al.*, 2014; SULLA *et al.*, 2016).

Esses resultados são semelhantes ao observado por Kang *et al.* (2010) indicando que o modelo de trauma utilizado no presente estudo foi capaz de causar lesões histológicas correlacionadas a déficits motores graves, como os descritos previamente. Esses achados também são compatíveis com o de estudos anteriores que avaliaram os efeitos do trauma medular em modelo murino (Fujiki *et al.*, 2005; Aziz *et al.*, 2014).

Corroborando aos achados histológicos Vialle *et al.* (2007) quando avaliaram a perda neuronal em seu estudo, observaram que não apenas no grupo tratado com Metilprednisolona, mas também no grupo controle, a presença de neurônios foi observada nos cortes craniais e caudais no centro da lesão e por esse motivo não houve diferença significativa entre eles.

Svobodova et al. (2018) ao analisarem o efeito neuroprotetor sinérgico de Curcumina e Galato de Epigallocatequina contra lesão medular, encontraram que todos os tratamentos mostraram um efeito positivo na diminuição do número de astrócitos. Além disso, o volume da região branca e região cinzenta não mostraram diferença significativa.

Curiosamente Duan et al. (2018) observaram em seu estudo que os volumes das áreas danificadas foram observados no 3º dia e na 8ª semana após a lesão, além das regiões comprometidas, presença de células da glia e hemorragia foram maiores no grupo lesão do que os grupos que receberam tratamentos.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o método cromatográfico desenvolvido foi útil para a obtenção do perfil cromatográfico do EACPG e, ainda, para a identificação e quantificação dos marcadores químicos ácido gálico e ácido elágico, os quais apresentaram alta concentração no extrato. Além disso, os parâmetros de validação apresentaram-se conforme o recomendado pela legislação vigente, garantindo a eficiência e reprodutibilidade do método.

Além disso, o EACPG nas doses de 100 e 300mg/kg mostraram-se tão eficazes quanto o fármaco padrão Metilprednisolona em acelerar a recuperação funcional motora da medula espinal em ratos. O EACPG na dose de 100mg/kg promoveu o reestabelecimento do número médios de neurônios e reduziu a gliose nas secções histológicas de medulla espinal de maneira semelhante a Metilprednisolona (fármaco controle). O modelo experimental de lesão no lado direito da medulla espinal não promoveu alterações significativas na arquitetura morfológica tecidual no lado contralateral (lado esquerdo) no período tempo estudado. Os resultados sugerem, portanto, que o EACPG possui uma ação neuroprotetora frente a lesão medular espinal por hemissecção torácica.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, M. B.; NILSSON, I.; LEWANDOWSK, S. A.; KJELL, J.; CODELUPPI, S.; L Olson, I.; Eriksson, U. Imatinib Enhances Functional Outcome after Spinal Cord Injury. *PLoS ONE*, 2012, 7 (6): 63-71.
- AFAQ, F.; SALEEM, M.; KRUEGER, C. G.; REED, J. D.; MUKHTAR, H. Anthocyanin- and hydrolyzable tannin-rich pomegranate fruit extract modulates MAPK and NF- κ B path ways and inhibits origenesis in CD-1 mice. *Int J Cancer* 2005; 113 (3): 423-433.
- AHMED, A. H.; SUBAIEA, G. M.; EID, A.; LI, L.; SEERAM, N. P.; ZAWIA, N. H. *Pomegranate extract modulates processing of amyloid- β precursor protein in an aged Alzheimer's disease animal model*. *Curr Alzheimer Res.* 2014;11(9):834-43.
- AHUJA CS, MARTIN AR, FEHLINGS M. Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000 Res.*; 5:5. 2016.
- ALVES, M.J.; FERREIRA, I. C. F. R.; FROUFE, J. J. C.; ABREU, R. M. V.; MARTINS, A.; PINTADO, M. Antimicrobial activy of phenolic compounds identified in wild mushrooms, SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, v. 155, 346-357, 2013.
- AL-MUAMMAR MN; KHAN F, Obesity: the preventive role of the pomegranate (*Punica granatum*). *Nutrition* 28:595-604, 2012.
- AHMED, M. A.; EL MORSY, E. M.; AHMED, A. A. *Pomegranate extract protects against cerebral ischemia/reperfusion injury and preserves brain DNA integrity in rats*. *Life Sci.* 2014 Aug 21;110(2):61-9.
- AKHTAR S, ISMAIL T, FRATERNALE D, SESTILI P. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chem.* 2014; 174:417-25.
- AKHTAR, S.; ISMAIL, T.; FRATERNALE, T.; SESTILI, P. Pomegranate peel and peel extracts: chemistry and food features. *Food Chemistry, Barking* 2015, 174, 417-425.
- AMERICAN SPINAL INJURY ASSOCIATION. Spinal cord injury statistics. Epi Info [online]. 2013 [acessado em 20 mar 2016] Disponível em: <http://www.asia-spinalinjury.org>
- ANDRADE M.J.; GONÇALVES S. Lesão Medular Traumática. *Recuperação Neurológica e Funcional*. *Acta Med Port.* 2007; 20(5): 401-406.
- ANDRADE, S. A.; SALOMON, B. T; BEHLING S. C.; MAHL D. C.; HACKENHAAR, S. F.; PUTTI, J.; BENFATO, S. MARA. Alpha-lipolic acid restores tear production in an animal model of dry eye, *Experimental Eye Research* 2014, 120: 1-9.
- Anibal PC, Teixeira IT, Foglio MA, Höfling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of *Punica granatum* L. and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of. *Braz J Microbiol.* 2013;44(3):839-48.
- ARVANIAN, V. L.; SCHNELL, L.; LOU, L.; GOLSHANI, R.; HUNANYAN, A.; GHOSH, A.; PEARSE, D. D.; ROBINSON, J. K.; SCHWAB, M. E.; FAWCETT, J. W.; MENDELL, L. M. CHRONIC spinal hemisection in rats induces a progressive decline in transmission in uninjured fibers to motoneurons. *Experimental Neurology*, v. 216 n. 2, p. 471-80, 2009.
- BAGRI, P.; ALI, M.; AERI, V.; BHOWMIK, M.; SULTANA, S. Antidiabetic effect of *Punica*

granatum flowers: Effect on hyperlipidemia, pancreatic cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology*. 2010; 47 (1): 50-54.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A Sensitive and Reliable Locomotor Rating Scale for Open Field Testing in Rats. *Journal of Neurotrauma*, v. 12, n. 1, p. 1-21, 1995.
Batchelor PE, Wills TE, Skeers P, et al. Meta-analysis of pre-clinical studies of early decompression in acute spinal cord injury: a battle of time and pressure. *PLoS One*. 2013;8(8):72659.

BASTOS, T. S. Efeito antitumoral induzido por apoptose e avaliação dos possíveis efeitos toxicológicos do extrato aquoso de punica granatum linn em modelo murino. [Dissertação]. Sergipe: *Universidade Tiradentes*; 2014.

BELCAVELLO, L. et al. Citotoxicidade e danos ao DNA induzidos pelo extrato de Zornia diphylla, uma planta medicinal. *Natureza online*, v.10, n.3, p. 140-145, 2012. Disponível em: http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/08_BelcavelloLetal_140145.pdf.

BENINI, Emanneli Bassani et al. Valorização da flora nativa quanto ao potencial fitoterápico. 2010. *Revista Destaques Acadêmicos*, 2010 - CCBS/UNIVATES, 2, (3): 2176-3070.

BENSAAD L. A., KIM, K, W.; CHIN C, Q.; KIM, W, R; MUSTAFA S, Antiinflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from Punica granatum. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17:4, 2017.

BOLAND, R. A.; LIN, C. S.; ENGEL, S.; KIEMAN, M. C. Adaptation of motor function after spinal cord injury: novel insights into spinal shock. *Brain* 2011, 134 (2): 495-505.

BOROCHOV-NEORI, H.; JUDEINSTEIN, S.; TRIPLER, E.; HARARI, M.; GREENBERG, A.; SHOMER, I. Seasonal and cultivar variations in antioxidant and sensory quality of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit. *Journal of Food Composition and Analysis*, San Diego, 2009, 22 (3): 189-195.

BOTELHO, R. V. et al. Epidemiology of traumatic spinal injuries in Brazil: systematic review. *Arquivos Brasileiros de Neurocirurgia* 2014. 33 (2), 100-106.

BOWERS CA, KUNDU B, ROSENBLUTH J, HAWRYLUK GWJ (2016) Patients with Spinal Cord Injuries Favor Administration of Methylprednisolone. *Plos one* 11(1).

BRAIDY, N.; SELVARAJU, S.; ESSA, M. M.; VAISHNAV, R.; AL-ADAWI, S.; AL-ASMI, A.; AL-SENAWI, H.; ABD ALRAHMAN ALOBAIDY, A.; LAKHTAKIA, R.; GUILLEMIN, G. J. Neuroprotective effects of a variety of pomegranate juice extracts against MPTP-induced cytotoxicity and oxidative stress in human primary neurons. *Oxid Med Cell Longev*. 2013: 685909.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. *Diretrizes de Atenção à Pessoa com Lesão Medular*. Brasília, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 julho 2017.

CARDOSO, J. E.; SILVA, J. L.; MARTINS, M. V. V.; MOREIRA, R. C.; VIANA, F.M.P.;

CHAVES, L.G, et al., Ocorrência e controle químico da antracnose em plantio comercial da romãzeira no Estado do Ceará. Fortaleza: Embrapa 2011.

CARLSON, N. G.; ROJAS, M. A.; REDD, J. W.; TANG, P.; WOOD, B.; HILL, K. E.; ROSE, J. W. Cyclooxygenase-2 expression in oligodendrocytes increases sensitivity to excitotoxic death. *Journal of Neuroinflammation* 2010, 7: 25.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC, Fundamentos, Estratégias e Validação. São Carlos: Edufscar, 2001.

CELIK, F.; GOCMEZ, C.; BOZKURT, M.; KAPLAN, I.; KAMASAK, K.; AKIL, E.; DOGAN, E.; GUZEL, A.; UZAR, E. *Neuroprotective effects of carvacrol and pomegranate against methotrexate-induced toxicity in rats*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2013 Nov;17(22):2988-93.

CELIK, I.; TEMUR, A.; ISIK, I. Hepatoprotective role and antioxidant capacity of pomegranate (*Punica granatum* L.) flowers infusion against strychnine-exposed rats. Food and Chemical Toxicology. 2009; 47:145-149.

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Antiproliferative potential and DNA scission on inhibitory activity of phenolics from whole millet grains. *Journal of Functional Foods*, Saint John's 2011, 3, 159-170.

COUGHLIN AR. Secondary injury mechanisms in acute spinal cord trauma. *J Small Anim Pract*. 2013;203(1):217-34.

CROWE, M.J., BRESNAHAN, J.C., SHUMAN, S.L., MASTERS, J.N., BEATTIE, M.S., Apoptosis and delayed degeneration after spinal cord injury in rats and monkeys. *Nat Med* 3, 73-76. 1997.

DAVID, S.; KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after 5 spinal cord injury. *Natural Review Neuroscience* 2011,12 (7): 388-399.

DITUNNO, J. F.; LITTLE, J.W.; TESSLER, A.; BURNS, A.S. Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord* 2004, 42 (7): 383-395.

DONNELLY, D. J.; POPOVICH, P. G. Inflammation and its role in neuroprotection, 15 axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurology* 2008, 16 (2): 378-388.

DORSETT, C.R., MCGUIRE, J.L., DEPASQUALE, E.A.K., GARDNER, A.E., FLOYD, C.L., MCCULLUMSMITH, R.E. Glutamate neurotransmission in rodent models of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 10, 1-10, 2016.

Duan, Q.H.; Li Wu, Q.; Yao, X.; You Fan, B.; Yu Shi, H.; Xi Zhao, C.; Zhang, Y.; Bo Li | Chao Sun.; Hong Kong, X.; Fu Zhou, F.; Qing Feng, S. Nafamostat mesilate attenuates inflammation and apoptosis and promotes locomotor recovery after spinal cord injury. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. 2018; 1-10.

FADAVI A, BARZEGAR M, AZIZI MH, BAYAT M. Note: physicochemical composition of ten Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Iran. *Food Sci Technol Int*. 2005;11(2):113-9.

FEHLINGS, M. G., CADOTTE, D. W., FEHLINGS, L. N. A series of systematic reviews on the

treatment of acute spinal cord injury: a foundation for best medical practice. *J Neurotrauma* 2011, 28 (5) 1329-1333.

FIGLEY, S. A.; KHOSRAVI, R.; LEGASTO, J.M.; TSENG Y.F. Characterization of 4 vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic 5 spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma* 2014, 31 (6) p. 541-552.

FISHER, A. U.; CARLE, R.; KAMMERER, R. D.; Identification and quantification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) peel, mesocarp, aril and differently produced juices by HPLC-DAD-ESI/MS, *Food Chemistry*, 2011, 127: 807-821.

FITCH, M. T.; SILVER, J. Glial cells, inflammation, and CNS trauma. Modulation of the inflammatory environment after injury can lead to long-distance regeneration beyond the glial scar. In: KORDOWER, J. H. e TUSZYNSKI, M. H. (Ed.). *Central Nervous System Regeneration* 2008. London: Academic Press.

FLEMING, J. C.; NOREMBERG, M.D.; RAMSAY, D.A.. The cellular inflammatory 14 response in human spinal cords after injury. *Brain* 2006,129 (12): 249-269.

FOROUZANFAR, F.; GOLI, A. A.; ASADPOUR, E.; GHORBANI, A.; SADEGHNIA, R. H. Protective Effect of *Punica granatum* L. against sérum/ Glucose Deprivation- Induced PC12 Cells Injury, *Evidence – Based Complementary and Alternative Medicine* 2013, 2-9.

FUSTER-MUÑOZ E, ROCHE E, FUNES L, MARTÍNEZ-PEINADO P, SEMPERE J AND VICENTE-SALAR N, Effects of pomegranate juice in circulating parameters, cytokines, and oxidative stress markers in endurance-based athletes: A randomized controlled trial. *Nutrition* 32:539-545, 2016.

GAGE, G.J., KIPKE, D.R., SHAIN, W. Whole Animal Perfusion Fixation for Rodents. *J. Vis. Exp.* 2012 (65):3564.

GERARDO-NAVA, J.; MAYORENKO, I.I.; GREHL, T,. Differential pattern of neuroprotection in lumbar, cervical and thoracic spinal cord segments in na organotypic rat model of glutamate-induced excitotoxicity. *Journal Chemical Neuroanatomy* 2013, 53: 11-17.

GOCMEZ C, CELIK F, KAMASAK K, KAPLAN M, UZAR E, ARIKANOGLU A, EVLIYAOGU O. Effects of intrathecal caffeic acid phenethyl ester and methylprednisolone on oxidant/antioxidant status in traumatic spinal cord injury

GOEZ-PINILLA, F.; NGUYEN, T. T. J. Natural mood foods: the actions of polyphenols against pschiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience* 2012, *Amsterdam*, 15 (3), 127-133.

GUILHERMINO, Jislaine de Fátima et al. Desafios e Complexidade para Inovação a partir da Biodiversidade Brasileira. *Revista de Pesquisa e Inovação Farmacêutica*, 2015, 4, (1): 18-30.

GULLON, B.; PINTADO, M.E.; PEREZ-ALVAREZ, J. A.; VIUDA-MARTOS, M. Assessment of polyphenolic profile and antibacterial activity of pomegranate peel (*Punica granatum*) flour obtained from co-product of juice extraction. *Food Control*, Vurrey 2016, 59: 94-68.

HARTMAN, E. R.; SHAH, A.; FAGAN, M. A.; S; PARSADANIAN, M.; SHULMAN, N. R.; Pomegranate juice decreases amyloid load and improves behavior in a mouse modelo of

Alzheimer's disease, *Neurobiology of Disease* 2006, 506-515.

HE B, NAN G, Neuronal regeneration after acute spinal cord injury in adult rats, *The Spine Journal* 2016 xxx,xxx

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: A review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. *J Ethnopharmacol* 2012; 143 (2): 397-405.

JADOON S, KARIM S, BIN ASAD MHH, AKRAM MR, KHAN AK, MALIK A, et al. Anti-aging potential of phytoextract loaded-pharmaceutical creams for human skin cell longevity. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015:709628.

JAZAYERI, S. B. et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *European Spine Journal*, v. 24, n. 5, 905-18, 2015.

JIA, Z.; ZHU, H.; LI, J.; WANG, X.; MISRA, H.; LI, Y. Oxidative stress in spinal cord injury and antioxidant-based intervention. *Spinal Cord*. 2012; 50 (4): 264-274.

JING Y, XUEHUA L, YI Z, GUOZHONG W, CHUNJIN G, QINGJUN S. Hyperbaric oxygen alleviates experimental (spinal cord) injury by downregulating HMGB1/NF- κ B expression. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2013;38(26):1641–8.

JOHANNINGSMEIER, S.D.; HARRIS, G.K. Pomegranate as a Functional Food and Nutraceutical Source. *Annual Reviews of Food Science and Technology* 2011, Palo Alto, 2, 181-201.

JOHNSON, W. L.; JINDRICH, D. L.; ROY, R. R.; EDGERTON, V. R. Quantitative metrics of spinal cord injury recovery in the rat using motion capture, electromyography and ground reaction force measurement. *Journal of Neuroscience Methods*, v. 206, n. 1, p. 65-72, 2012.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S. EFTEKHARPOUR, E.; WANG, J.; SCHUT, D. Chondroitinase and growth factors enhance activation and oligodendrocyte differentiation of endogenous neural precursor cells after spinal cord injury. *PLoS One* 7 (5): 375-389, 2012.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S.; EFTEKHARPOUR, E.; WANG, J.; SCHUT, D. Synergistic effects of transplanted adult neural stem/progenitor cells, chondroitinase, and growth factors promote functional repair and plasticity of the chronically injured spinal cord. *Journal Neuroscience*, 30 (5):1657-1676, 2010.

KAPOOR R, RONNENBERG A, PULEO E, CHATTERTON JR RT, DORGAN JF, SEERAM NP AND STURGEON SR, Effects of pomegranate juice on hormonal biomarkers of breast cancer risk. *Nutr Cancer* 67:1113-1119, 2015.

KAZEMI, M.; KARIM, R.; MIRHOSSEINI, H.; ABDUL HAMID, A. Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food Chem*. 2016, 1;206:156-66

KIM, H. S.; HA, Y. K.; KIM, S. *Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials*, Clinics in Orthopedic Surgery; 2017; 9 (1).

KIM, H. S.; HA, Y. K.; KIM, S. *Spinal Cord Injury and Related Clinical Trials*, Clinics in Orthopedic Surgery; 2017; 9 (1).

KOJADINOVIC MI, ARSIC AC, DEBELJAK-MARTACIC JD, KONIC-RISTIC AI, KARDUM ND, POPOVIC TB.; GLIBETIC MD, Consumption of pomegranate juice decreases blood lipid peroxidation and levels of arachidonic acid in women with metabolic syndrome. *J Sci Food Agric* 97:1798-1804, 2017

KRAMER, A. S.; HARVEY, A.R.; PLANT, G.W. Systematic review of induced 10 pluripotent stem cell technology as a potential clinical therapy for spinal cord 11 injury. *Cell Transplant* 2013, 22 (4): 571-617.

KRETZER, R. M. A clinical perspective and definition of spinal. Cord Injury Spine, *Hagerstown*; 2016; 41 (7), 27.

KUSHCHAYEV, S.V.; GIER, M.B.; HOM ENG, D.; MARTIROSYAN, N.L.; ESCHBACHER, J.M.; MORTAZAVI, M.M.; et al. Hyaluronic acid scaffold has a neuroprotective effect in hemisection spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery: Spine* 2016.

LEE, C-CHEN, L-G., LIANG, W-L., WANG, C-C. Anti-inflammatory effects of Punicagranatum Linne in vitro and in vivo. *J. Food Chemistry*, 2010; 118 (): 315-322.

LEE, C-CHEN, L-G., LIANG, W-L., WANG, C-C. Anti-inflammatory effects of Punicagranatum Linne in vitro and in vivo. *J. Food Chemistry*, 2010; 118 (7): 315-322.

LESKOVAR, A.; MORIARTY, L.J.; TUREK, J.J.; SCHOENLEIN, I.A.; BORGES R.B. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. *The Journal of Experimental Biology* 2000, 203 (12) p. 1783-1795.

Li G, Xu Y, Wang X, Zhang B, Shi C, Zhang W, et al. Tannin-Rich Fraction from Pomegranate Rind Damages Membrane of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 2014;11(4):313–9.

LI, L.S.; YU, H.; RAYNALD, R.; WANG, X. D.; DAI, G, H.; CHENG, H.; XUE, B, L.; YI, H. Anatomical mechanism of spontaneous recovery in regions caudal to thoracic spinal cord injury lesions in rats. *PeerJ*, v.5, p. 128-165, 2017.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. Plantas ornamentais no Brasil – arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 3.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2001. 1088p.

LUKÁŠ R, ZÝKOVÁ I, BARSA P, SRÁM J. Current role of methylprednisolone in the treatment of acute spinal cord injury. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 78:305–13, 2011.

LIU, X.Z., XU, X.M., HU, R., DU, C., ZHANG, S.X., MCDONALD, J.W., DONG, H.X., WU, Y.J., FAN, G.S., JACQUIN, M.F., HSU, C.Y., CHOI, D.W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J. Neurosci.* 17, 5395–5406, 1997.

M. Fujiki, Z. Zhang, L. Guth, and O. Steward, “Genetic influences on cellular reactions to spinal cord injury: activation of macrophages/microglia and astrocytes is delayed in mice carrying a mutation (WldS) that causes delayed Wallerian degeneration” *The Journal of Comparative Neurology*, vol. 371, no. 3, pp. 469–484, 1996

MANDALARI, G. B.; GENOVESE, T.; BISIGNANO, C.; MAZZON, E.; WICKHAM, M. S. J.; PAOLA, R. D.; BISIGNANO, G.; CUZZOCREA, S. Neuroprotective effects of almondskins in experimental spinal cord injury. *Clinical Nutrition*, 2011, 30 (5): 221-233.

MASOUDI, A.; DARGAHI, L.; ABBSZADEH, F.; POURGHOLAMI, H. M.; ASGARI, A.; MANOOCHHEHRI.; JORJANI, M.; Neuroprotective effects of astaxanthin in a rat model of spinal cord injury, *Brain Research Bulletin* 2017: 1258-1296.

MIGUEL M.G, NEVES M. A., MARIA D. ANTUNES “Pomegranate (*Punica granatum* L.): A medicinal plant with myriad biological properties - A short review” ., *Journal of Medicinal Plants Research*, 2010; 4(25): 2836-2847.

MOORE, K. L. et al. Fundamentos de anatomia clínica. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

MOREIRA, I. S.; ROCHA, R.H. C.; PAIVA, E. P.; SILVA, H. S.; SOUSA, F.A. Biometria e componentes físico-químicos de romã armazenada sob refrigeração. *Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia*, 2015 45 (2), 209-215.

MYER, D. J.; GURKOFF, G. G.; LEE, S. M.; HOVDA, D. A. Essential protective roles of reactive astrocytes in traumatic brain injury. *Brain* 2006, 129 (10): 2761-72.

Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, Bayer BM, Bregman BS. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord. *Exp Neurol*. 2003;184(1):313-325.

NASCIMENTO, M. F. *Desenvolvimento, caracterização e avaliação do potencial cicatrizante de membranas de gelatina contendo extrato aquoso de punica granatum linn*. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)- Universidade Tiradentes, Aracaju, 2013.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER, Facts and Figures at a Glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2016.

NATIONAL SPINAL CORD INJURY STATISTICAL CENTER, Recent Trends in Causes of Spinal Cord Injury. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham, 2015.

NORENBERG, M. D.; SMITH, J.; MARCILLO, A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *Journal of Neurotrauma* 2004, 21 (4): 429-440.

OLIVEIRA, S. G. D. et al., Aneth no medicinal survey on phytotherapy with professional and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012;140 (2), 428– 437.

ORAK HH, YAGAR H, ISBILIR SS. Comparison of antioxidant activities of juice, peel, and seed of pomegranate (*Punica granatum* L.) and inter-relationships with total phenolic, Tannin, anthocyanin, and flavonoid contents. *Food Sci Biotechnol*. 2012;21(2):373–87.

OSHIRO, Mariana Cardoso et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. 2016. *Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia* 2016 4, (4): 116-122.

PATERNITI, P.; MELANI, A.; CIPRIANI, S.; CORTI, F.; MELLO, T.; MAZZON, E.; ESPOSITO, E.; BRAMANTI, P.; CUZZOCREA, S.; PEDATA, F. Selective adenosine A2A receptor agonists and antagonists protect against spinal cord injury through peripheral and central effects. *Journal of Neuroinflammation*, 2011; 8(31): 2-14.

PEIN, J.; FAN, H.L; NAN, K; LI, J.; WANG, Z.K; HYSA alleviates secondary neuronal death through attenuating oxidative stress, Inflammatory response and neural apoptosis in SD rat spinal compression injury, *Journal of Neuroinflammation* 2017; 20 (1) 17-97.

PRAKASH, C. V. S.; PRAKASH, I. "Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (Punicagranatum) Juice, Seed and Peel-A Review". *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 2011; 1 (1):1-18.

PRAKASH, C. V. S.; PRAKASH, I. "Bioactive Chemical Constituents from Pomegranate (Punicagranatum) Juice, Seed and Peel-A Review". *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 2011; 1 (1):1-18.

PROFYRIS, C.; CHEEMA, S. S.; ZANG, D. Degenerative and regenerative mechanisms governing spinal cord injury. *Neurobiology Disorder* 2004, 15 (3): 415- 436.
Ramadan WS, Abdel-Hamid GA, Al-Karim S, Abbas AT. Histological, immunohistochemical and ultrastructural study of secondary compressed spinal cord injury in a rat model. *Folia Histochem Cytobiol*. 2017;55(1):11-20. doi: 10.5603/FHC.a2017.0001.

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, N.; SEPULVEDA, E.; CHAVEZ, J. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of food Science and Technology*, Oxford 2010, (7): 13856-1394.

ROCHA, F. A. G., et al. O USO TERAPÊUTICO DA FLORA NA HISTÓRIA MUNDIAL. 2014
HOLOS, 2015, 31, (1): 1807-1600.

ROJANATHAMMANEE, L.; PUIG, K.L.; COMBS, C.K. Pomegranate polyphenols and extract inhibit nuclear factor of activated T- cell activity and microglial activation in vitro and in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Journal of Nutrition*, Philadelphia 2013, 143 (5), 597-605.

ROSAS-BURGOS, E.C.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; NOGUERA-ARTIAGA L.; KAČÁNIOVÁ, M.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, F.; CÁRDENAS-LÓPEZ, J.L.; CARBONELL-BARRACHINA, Á.A. Antimicrobial activity of pomegranate peel extracts as affected by cultivar. *J Sci Food Agric*. 2017, 97(3):802-810

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A*, v. 721, p. 3-14, 1996.

S,W, BanG.; K, T, Kim.; Y, J, Seo.; D, C, ChO.; J,K, Sung, C, H, Kim, Curcumin Increase the Expression of Neural Stem/Progenitor Cells and Improves Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Korean Neurosurg Soc* 61 (1): 10-18, 2018.

SCHWAB, J. M.; BRECHTEL, K.; NGUYEN, T. D. Persistent accumulation of 25 cyclooxygenase-1 (COX-1) expressing microglia/macrophages and upregulation by 26 endothelium following spinal cord injury. *Journal Neuroimmunology* 2000, 111, (1-2): 122-130.

SHEMA-DIDI L, SELA S, ORE L, SHAPIRO G, GERON R, MOSHE G AND KRISTAL B, One year of pomegranate juice intake decreases oxidative stress, inflammation, and incidence of infections in hemodialysis patients: a randomized placebo-controlled trial. *Free Radical Biol Med* 53:297-304, 2012.

SHAH, R.R.; TISHERMAN, S.A. Spinal cord injury. In: Falter, F., Screat on, N.J. *Imaging the ICU Patient*. 1 ed. Londres: Springer London 2014. p. 377-380.

SHAYGANNIA, E.; BAHMANI, M.; ZAMANZAD, B.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. A Review Study on *Punica granatum* L. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, Thousand Oaks, 2015.

SIDDIQUI, A. M.; KHAZAEI, M.; FEHLINGS, M. G. Translating Mechanisms of Neuroprotection, Regeneration, and Repair to Treatment of Spinal Cord Injury. *Progress in Brain Research*, 2015: 47.

SIDDIQUI, M. M.; WILSON K. M.; EPSTEIN, M. M. Vasectomy and risk of aggressive prostate cancer: A 24-year follow-up study. *Journal Clinical Oncology*, n. 32, p.3033- 12 3038, 2014.

SILVA, G.A.; SCHOELLER, S.D.; GELBCKE, F.L.; CARVALHO, Z.M.F.C.; SILVA, - *Epidemiologia da paraplegia traumática em um Centro de Reabilitação em Fortaleza, Ceará, Brasil, EFD esportes*, 2012; 17(171): 15-21.

SINGH, A. et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord Injury. *Journal of Clinical Epidemiology*, 6309-31, 2014.

SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Initial experiments in high-performance liquid chromatographic method development. I. Use of a starting gradient run. *Journal of Chromatography A*, v. 721, p. 3-14, 1996.

SOHRAB G, EBRAHIMOF S, SOTOUDEH G, NEYESTANI TR, ANGOORANI P, HEDAYATI M AND SIASI F, Effects of pomegranate juice consumption on oxidative stress in patients with type 2 diabetes: a single-blind, randomized clinical trial. *Int J Food Sci Nutr* 68:249-255, 2017.

Svobodova R.S.; Amin A.G.; Dubisova J, Zaviskova K, Kubinova S¹, Schmidt, Jhanwar-Uniyal, Jendelova. Does combined therapy of curcumin and epigallocatechin gallate have a synergistic neuroprotective effect against spinal cord injury. 2018;13(1):119-127.

TATOR CH, FEHLINGS MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *J Neurosurg*. 1991;75(1):15–26.

TATOR, C. H.; FEHLINGS, M. G. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery* 1991; 75 (1): 15-26.

TEIXEIRA DA SILVA, J. A.; RANA, T. S.; NARZARY, D.; VERMA, N.; MESHAM, D. T.; RANADE, S. A. Pomegranate biology and biotechnology: A review. *Sci Hortic*. 2013; 160: 85-107.

TRUJANO, G, E, M.; PELLICER, F.; MENA, P.; MORENO, A, D.; VIGUERA, G, C.; Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a pomegranate (*Punica granatum* L.) extract rich in ellagitannins, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 2015: 1-5.

TY, Y.; JY, L.; CM, C.; HC, K.; Oh, T. H. Neuroprotective effect of *Scutellaria baicalensis* on spinal cord injury in rats. *Journal Neuro chemistry*, 2009; 110 (4): 1276-87.

TZEKOU, A.; FEHLINGS, M. G. Treatment of spinal cord injury with intravenous immunoglobulin G: preliminary evidence and future perspectives. *J Clin Immuno* 2014, 34 (1): 132-138.

ULNDREAJ A, CHIO JC, AHUJA CS, FEHLINGS MG. Modulating the immun response in spinal cord injury. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(10):1-3.

ULNDREAJ A, CHIO JC, AHUJA CS, FEHLINGS MG. Modulating the immun response in spinal cord injury. *Expert Rev Neurother*. 2016;16(10):1-3.

VAQUERO J, ZURITA M, OYA S, AGUAYO C, BONILLA C. Early administration of methylprednisolone decreases apoptotic cell death after spinal cord injury. *Histol Histopathol*, 2006, 21:1091-1102.

VENKATESAN, R.; JI, E.; KIM, S. Y. Phytochemicals that regulate neurodegenerative disease by targeting neurotrophins: a comprehensive review. *BioMed research international*. 2015; xx(xx).

VIALLE, E.N. ; VIALLE, L.R.; 1, BLEGGI-TORRES, L. F.; SAKAMOTO, K.S. Histological evaluation of the effects of methylprednisolone on experimental medullary lesion in rats. *Rev Bras Ortop*. 2007;42(4):101-13.

VIEIRA, S.C.H.; SOLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZARATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. *Rev. bras. Farmacogn*. 2010; 20(1): 28-34.

VIUDA-MARTOS, M.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J. A. Pomegranate and its many functional components as related to human health: A review. *Compr Ver Food Sci Food Saf* 2010; 9(6):635-654.

WANG, H,Y.; CHEN, J.; ZHOU, J.; NONG, F.; LV, H, J.; LIU, J.; Reduced inflammatory cell recruitment and tissue damage in spinal cord injury by acellular spinal cord scaffold seeded with mesenchymal stem cells, *Experimental and therapeutic medicine* 2017, 13: 203-207.

WANG, J.; YU, L.; JIANG, C.; CHEN, M.; OU, C.; WANG, J. Bone marrow mononuclear cells exert long-term neuroprotection in a rat model of ischemic stroke by 100 promoting arteriogenesis and angiogenesis. *Brain, Behavior, and Immunity* 2013, 34 (1): 56-66.

WANG, Y.; ZHANG, H.; LIANG, H.; YUAN, Q.; Purification, antioxidant activity and protein-precipitating capacity of punicalin from pomegranate husk, *Food Chemistry* 2013; 138: 437-443

YANG, J.; LEE, R.; HENNING, S.M.; THAMES, G.; HSU, M.; MANLAM, H et al., Soy protein isolate does not affect ellagitannin bioavailability and urolithin formation when mixed with pomegranate juice in humans. *Food Chemistry, Barking* 2016, 194, 300-303.

YOUNG, W. Spinal cord regeneration. *Cell Transplant* 2014, 23 (4-5): 573-611.

YU, T. S.; CHO, D.; KIM, K.; NAM, K.; CHO, H.; SUNG, J. Neuroprotective Effect of Treatment of Valproic Acid in Acute Spinal Cord Injury. *Journal Korean Neuro surgical Society*, 2012; 51:191-198.

YU, W. R.; LIU, T.; FEHLINGS, T. K.; FEHLINGS, M. G. Involvement of mitochondrial 26 signaling pathways in the mechanism of Fas-mediated apoptosis after spinal cord 27 injury. *Eurean Journal Neuroscience* 2009, 29 (1): 114-131.

YU, T. S.; CHO, D.; KIM, K.; NAM, K.; CHO, H.; SUNG, J. Neuroprotective Effect of Treatment of Valproic Acid in Acute Spinal Cord Injury. *Journal Korean Neurosurgical Society* v. 51, p.191-198, 2012.

ZENG, F-S.; ZHANG, L.; CUI, L.; HUANG, Q.; SUN, M.; LIUB-L.; WANG.; SUN Q-S.; Expression of autophagy in different stages of neurogenic bladder after spinal cord injury in

rats, *International Spinal Cord Society All rights reserved*, 2017: 1362-4393.

Zhang C, Zhang G, Rong W, Wang A, Wu C, Huo X Early applied electric field stimulation attenuates secondary apoptotic responses and exerts neuroprotective effects in acute spinal cord injury of rats. *Neuroscience*, 2015a, 291:260-271.

Zhang J, Chen H, Duan Z, et al. The effects of co-transplantation of olfactory ensheathing cells and schwann cells on local inflammation environment in the contused spinal cord of rats. *Mol Neurobiol.* 2016.

Zhang J, Chen H, Duan Z, et al. The effects of co-transplantation of olfactory ensheathing cells and schwann cells on local inflammation environment in the contused spinal cord of rats. *Mol Neurobiol.* 2016.

Zhang LH, Li LL, Li YX, Zhang YH. In vitro antioxidant activities of fruits and leaves of pomegranate. *Acta Hortic.* 2008; 765:31–4.

ZHAO, Z.; LIU, N.; HUANG, J.; LU, P.; XU, X. Inhibition of cPLA2 activation by *Ginkgobiloba* extract protects spinal cord neurons from glutamate excitotoxicity and oxidative stress-induced cell death. *Journal Neurochemistry*, 2011, 116 (6): 1057-1065.

YU, T. S.; CHO, D.; KIM, K.; NAM, K.; CHO, H.; SUNG, J. Neuroprotective Effect of Treatment of Valproic Acid in Acute Spinal Cord Injury. *Journal Korean Neurosurgical Society*, v. 51, p.191-198, 2012.

ANEXO- REGISTRO DE APROVAÇÃO (PARECER CEUA)



UNIVERSIDADE TIRADENTES
DIRETORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL - CEUA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA CEUA

Certificamos que a proposta intitulada " Efeitos do Tratamento com Extrato Aquoso da Casca do Fruto de *Punica granatum* Após Lesão Medular em Ratos: avaliação funcional e neuroprotetora", registrada com o nº 010716R, sob a responsabilidade de Margarete Zamardo Gomes, que envolve a utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, em reunião de 28/10/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa
Vigência da autorização	01/11/2016 a 05/02/2018
Espécie/linhagem/raça	Rattus norvegicus/Wistar
Nº de Animais	60
Peso/idade	250 a 300 g / 2 a 3 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério UNIT

UNIVERSIDADE TIRADENTES - UNIT

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal - CEUA

Aracaju, 28 de outubro de 2016

Maria Júlia Nardelli
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso Animal – CEUA
Universidade Tiradentes - UNIT

ANEXO- VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

5.4.3. Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas de separação foram otimizadas avaliando-se os seguintes fatores: parâmetros de eluição gradiente, composição da fase móvel, vazão e volume de injeção (Quadro 1).

Quadro 1: Fatores avaliados na otimização das condições cromatográficas.

Parâmetros de eluição gradiente	- $\Delta\%$ B/min - tempo de gradiente (min)
Composição da fase móvel	- ACN:água - solução de ácido fórmico 0,1%:ACN com ácido fórmico 0,1%.
Vazão	- 1 mL/min - 0,5 mL/min
Volume de injeção	- 10 μ L - 20 μ L

5.6. Validação do método

A validação do método quantitativo seguiu as normas estabelecidas pelo Guia para Validação de Métodos Analíticos, publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), mediante a Resolução RE nº 166, 24 de julho em 2017 (BRASIL, 2017). Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: linearidade, seletividade, efeito da matriz, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão.

6.3 Validação do método analítico

Para assegurar que um novo método analítico seja capaz de gerar informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma série de estudos experimentais denominados validação. A identificação e quantificação de uma substância por um método analítico só se torna confiável quando advinda de uma metodologia validada, o que garante comparabilidade e rastreabilidade (RIBANI et al., 2014). Sendo assim, o método analítico desenvolvido por CLAE-DAD para identificação e quantificação dos marcadores químicos no EACPG foi validado para garantir a confiabilidade do método e de seus resultados.

As figuras de mérito avaliadas na validação do método proposto foram linearidade,

seletividade, efeito da matriz, limite de detecção, limite de quantificação precisão e exatidão.