

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
ESCOLA DE ENFERMAGEM E FARMÁCIA – ESENFAR
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – CPGP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENFERMAGEM (MESTRADO)



Ana Carolina Santana Vieira

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Punica granatum* L. (ROMÃ)**

Maceió – AL
2014

ANA CAROLINA SANTANA VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Punica granatum* L. (ROMÃO)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Eliane Aparecida Campesatto

Co-orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Maria Lysete de Assis Bastos

Maceió – AL

2014

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico Bibliotecária
Bibliotecário: Maria Auxiliadora G. da Cunha

V657a Vieira, Ana Carolina Santana.
Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Púnica granatum* (**ROMÃ**) / Ana Carolina Santana Vieira. – 2014.
60 f. : il.

Orientadora: Eliane Aparecida CAmpesatto.
Co-orientadora: Maria Lysete de Assis Bastos.
Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal de Alagoas.
Escola de Enfermagem e Farmácia. Maceió, 2014.

Bibliografia: f. 52-60.

1. *Granatum*. 2. Enfermagem. 3. Nociceptividade. 4. Anti-inflamatórios.
I. Título.

CDU: 616-083:615.276

ANA CAROLINA SANTANA VIEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO ETANÓLICO DE *Punica granatum* L. (ROMÃ)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Enfermagem da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Enfermagem.

Aprovada em: 20/02/2014

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Eliane Aparecida Campesatto (Orientadora)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde – UFAL



Prof. Dr. Paulo Vitor Farago (Examinador Titular)
Universidade Federal de Ponta Grossa – UFG



Prof. Dr. Ednaldo Cavalcante de Araújo (Examinador Titular)
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

A Raul Vieira, meu pai (in memoriam).
“Saudade é uma dor que fere nos dois mundos.”
(Chico Xavier)

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e oportunidades de evolução e superação.

À Universidade Federal de Alagoas, pela oportunidade de realização de mais um objetivo em minha vida.

À minha mãe, Célia Vieira, pelo exemplo de força, coragem, superação e amor.

Ao meu amor e esposo, Eduardo, pelas mudanças, paciência, amor, compreensão e apoio durante todo esse tempo. Te amo!

À minha filha (minha vida), Maria Luiza, pela sua alegria e paciência em entender, apesar de tão pequena, minhas ausências como mãe para alcançar este objetivo.

Aos meus irmãos, Célia Beatriz, Renata e Raul Filho, pelo apoio e credibilidade.

À Profa. Dra. Eliane Aparecida Campesatto, minha orientadora, pela oportunidade de aprendizado, paciência e confiança. Minha eterna gratidão pela inspiração em seguir carreira na pesquisa experimental e na docência!

À Profa. Dra. Lysete de Assis Bastos, pela co-orientação e apoio neste trabalho. Você é um exemplo de que a enfermagem pode e deve estar inserida na pesquisa experimental.

À fofinha, Yolanda Karla, pela amizade, pelo apoio, pelos carões e paciência. Agora eu sei que eu tenho condições! Você é a melhor!

À Profa. Dra. Magna Suzana, pelas oportunidades a mim dadas e contribuições significativas neste trabalho!

Aos amigos Max Viana, Luiz Henrique e Maria Alice Falcão pelas horas de experimentos realizados juntos, pelos apelidos colocados e pela paciência em me inserir no mundo da Farmacologia. Continuarei “aperreando” bastante vocês!

Aos amigos do LaFI que me receberam muito bem (apesar do *bullying* por ser enfermeira) e me ensinaram tudo o que sei sobre pesquisa experimental: Anderson, Aline, Carol, Diego, Mariana, Morgana, Jefferson, Liliane, Gicele, Priscilla, Thays, Layse, Nívea, Geraldo, Amanda, Luiz Antônio, Elymaira, Luiz Henrique, Esteves, Walfrido, Thiago e Kaycke. Cada um de vocês contribuiu significativamente para todas as etapas deste trabalho. Sem vocês nada disso seria possível.

À Maria José de Lima (Dona Lia), pela doação dos frutos utilizados nesta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant’Ana e sua aluna Ingrid Sofia, pela colaboração na obtenção do extrato.

À Gabriela Muniz e Lívia Maria, pela colaboração durante o processo de prospecção.

Às amigas Clara, Cristina, Helenice, Lela, Rafella, Roberta e Ryanne, pela amizade e ajuda nos momentos importantes desta e de outras etapas da minha vida.

Às amigas de turma Fernanda Monteiro, Janine Holanda e Luciana Amorim, pela amizade e troca de experiência. Nossos momentos foram essenciais nesses dois anos de aprendizado. Vamos nos encontrar em outros momentos, tão importantes quanto este!

Aos amigos da turma Eduardo, Beatriz, Gabriela, Monise, Patrícia, Amanda, Luanna, Kátia e Neuzianne, pelos momentos engraçados, tensos e de trocas, cada um com seu objeto de estudo. Juntos aprendemos com Hessen que “conhecimento quer dizer uma relação entre sujeito e objeto”.

Aos professores do Mestrado em Enfermagem, em especial Dr^{as} Regina, Cristina e Célia, pelo conhecimento adquirido e experiências compartilhadas.

À equipe do Biotério da Universidade Federal de Alagoas.

Aos animais utilizados durante os experimentos. Minha eterna gratidão e respeito.

Minha gratidão àqueles que direta ou indiretamente, citados aqui ou não, colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Apesar das diversas alternativas farmacológicas existentes, é crescente o número de pesquisadores interessados em estudar os mediadores e a fisiopatologia da inflamação, pois os medicamentos que estão disponíveis no mercado apresentam eficácia limitada e/ou possuem efeitos adversos que restringem sua utilização. Sendo assim, é necessário que as pesquisas continuem na busca por opções mais eficazes. Uma das alternativas é a utilização de *Punica granatum* (romã) que na literatura há referência do uso de várias partes no tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias. Diante dos resultados de estudos anteriores sobre as ações da *P. granatum* e a necessidade de aumentar o conhecimento sobre suas aplicações, este estudo experimental tem como objetivo avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico da casca do fruto da *Punica granatum* (EEPG). As cascas, provenientes de Maragogi-AL, foram liofilizadas, trituradas, maceradas em etanol PA, filtradas e o produto final rotaevaporado, obtendo-se 65 g de EEPG que à análise fitoquímica constatou-se a presença de flavonoides, saponinas e taninos. Foram realizados ensaios de toxicidade *in vitro* (ensaio de MTT, nas doses de 1, 10 e 100 µg/mL) e *in vivo* (ensaio de toxicidade aguda, nas doses de 500 e 1000 mg/kg). Para avaliar a atividade antinociceptiva foram usados como modelos experimentais: ensaio de contorção abdominal induzido por ácido acético, teste da placa quente e nocicepção induzida por formalina e glutamato. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi analisada no ensaio de artrite induzida por agente de Freund. Para descartar um possível efeito que alterasse a performance motora dos animais, foi realizado o teste do campo aberto. Os resultados mostraram que as doses utilizadas não demonstraram sinais de toxicidade nos animais, não havendo morte, alteração de peso ou apetite, nem alteração dos outros parâmetros analisados; enquanto que em nível celular as doses submáximas testadas não apresentaram citotoxicidade. O tratamento com EEPG induziu a inibição, de forma significativa e dose-dependente ($DI_{50} = 7,9 \pm 1,7$ mg/kg) da ação nociceptiva do ácido acético e o E_{max} de $98,8 \pm 1,2\%$ foi alcançado na dose de 100 mg/kg. No ensaio de placa quente não foram observadas alterações no tempo de latência dos animais. No ensaio de formalina, o EEPG (100 mg/kg, v.o.) não inibiu a fase neurogênica (1ª fase). No entanto, a fase inflamatória (2ª fase) foi inibida em 51,7%. Na indução de nocicepção induzida por glutamato observou-se que o EEPG possivelmente age modulando negativamente esta via, seja por antagonizar suas ações via receptor ou inibição da via L-arginina-óxido nítrico. No ensaio de artrite, todas as doses testadas foram capazes de diminuir a inflamação na pata a partir do 3º dia de tratamento, prolongando-se até o final do mesmo. Por fim, no teste do campo aberto, foi possível observar que não houve alteração satisfatória dos parâmetros motores analisados, descartando-se um possível efeito sobre esse sistema. Os resultados obtidos neste trabalho dão suporte não somente a pesquisa com produtos naturais, como também à pesquisa por novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Novos estudos são necessários para definição dos mecanismos de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da casca do fruto da *P. granatum*, porém, os resultados obtidos dão suporte ao uso popular da planta.

Palavras-chave: *Granatum*. Enfermagem. Nociceptividade. Anti-inflamatórios

ABSTRACT

Despite existing several pharmacological alternatives, it is growing the number of researchers interested in studying the pathophysiology and mediators of inflammation, because the drugs that are currently available on the market have limited efficiency and/ or have adverse effects that limit their use. Thus, it is necessary to continue the research in the search for more effective options. One alternative is the use of *Punica granatum* (pomegranate) that in the literature there are reports of the use of many of its parts in the treatment of infectious and inflammatory diseases. Considering the results obtained in previous studies on the actions of *P. granatum* and the need to increase the knowledge about their applications, this study aimed to evaluate the anti-nociceptive and anti-inflammatory potential effects of ethanolic extract from fruits peels's *Punica granatum* (EEPG). Peels, from Maragogi-AL, were lyophilized, grinded, macerated in ethanol PA, filtered and the final product rotaevaporated, obtaining 65 g EEPG in which the phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids, tannins and saponins. Toxicity tests were performed *in vitro* (MTT assay at doses of 1, 10 and 100 mg/mL) and *in vivo* (acute toxicity test at doses of 500 and 1000 mg/ kg). To evaluate the antinociceptive activity were used as experimental models: writhing test induced by acetic acid, the hot plate test and formalin and glutamate-induced nociception. Anti-inflammatory activity evaluation was analyzed in the arthritis assay Freund agent-induced. To rule out a possible effect to alter the motor performance of the animals, the open field test was performed. Our results showed that the doses used showed no signs of toxicity in animals, with no death, change in weight or appetite, or change other parameters analyzed, whereas at the cellular level submaximal doses tested showed no cytotoxicity. EEPG treatment induced inhibition significantly and dependent-dose ($ID_{50} = 7.9 \pm 1.7$ mg/ kg), the nociceptive action of acetic acid and E_{max} of $98.8 \pm 1.2\%$ was reached at the dose 100 mg/ kg. In the hot plate test no change in the latency time of the animals was observed. In the formalin test, the EEPG (100 mg/ kg, p.o.) did not inhibit the neurogenic phase (1st phase). However, the inflammatory phase (phase 2) was inhibited for 51.7%. For the induction of nociception induced by glutamate was observed that the EEPG possibly acts modulating negatively this pathway, either by antagonizing their actions receptor-mediated or inhibiting the L-arginine-nitric oxide pathway. In the arthritis assay, all doses tested were able to decrease inflammation in the paw from the 3rd day of treatment, extending to the end of it. Finally, in the open field test, it was possible to observe that no satisfactory change of analyzed motor parameters, rulling out a possible effect on this system. The results of this study not only support research on natural products, but also to search for new analgesic and anti-inflammatory drugs. Further studies are needed to define the mechanisms of action of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of the fruits peel's of *P. granatum*, however, the results support the popular use of this plant.

Keywords: *Granatum*. Nursing. Nociception. Anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Transmissão da dor nociceptiva: da captação do estímulo por receptores sensoriais ao percusso e processamento da dor em nível central.....	17
Figura 2 -	Sinais característicos da inflamação	19
Figura 3 -	Recrutamento leucocitário no processo inflamatório.....	20
Figura 4 -	Frutos da espécie <i>Punica granatum</i>	25
Figura 5 -	Cascas do fruto de <i>Punica granatum</i>	29
Figura 6 -	Esquema do processo de obtenção do extrato etanólico da casca do fruto da <i>Punica granatum</i>	30
Figura 7 -	Contorção abdominal induzida por ácido acético.....	33
Figura 8 -	Teste do campo aberto.....	34
Figura 9 -	Teste da placa quente.....	35
Figura 10 -	Teste de nocicepção induzido por formalina.....	36
Figura 11 -	Pata dos ratos no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.....	47

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Efeito do EEPG no ensaio de MTT.....	39
Gráfico 2 -	Média dos pesos dos camundongos durante tratamento agudo com EEPG.	40
Gráfico 3 -	Consumo médio de ração durante tratamento agudo com EEPG.....	40
Gráfico 4	Efeito do EEPG no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.....	42
Gráfico 5 -	Efeito do EEPG no ensaio de placa quente.....	44
Gráfico 6 -	Efeito do EEPG no ensaio de nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	45
Gráfico 7 -	Efeito do EEPG no ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos.....	46
Gráfico 8 -	Efeito do EEP no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.....	48
Gráfico 9 -	Médio de peso dos baços dos ratos submetidos ao tratamento com veículo, dexametasona ou EEPG no ensaio de artrite induzida por adjuvante de Freund.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINEs	Anti-Inflamatórios Não Esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
ASIC	Canais Iônicos Sensíveis ao Ácido
Ca ⁺²	Cálcio
CCK-8	Colecistocinina 8
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina
CMC	Carboximetilcelulose
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DI ₅₀	Dose Inibitória Mediana
DL ₅₀	Dose Letal Mediana
DMEM	Meio Dulbeco Modificado por Eagle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DZP	Diazepam
EEPG	Extrato Etanólico da <i>Punica granatum</i>
E _{max}	Efeito máximo
e.p.m.	Erro Padrão da Média
GABA	Ácido gama aminobutírico
GRD	Gânglio da Raiz Dorsal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
ICBS	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
IMAO	Inibidor da Monoamino Oxidase
i.p.	Via Intraperitoneal

IL	Interleucinas
LaFI	Laboratório de Farmacologia e Imunidade
LPS	Lipopolissacarídeo
LOX	Lipoxigenase
LT	Leucotrieno
mL	Mililitro
MTT	[brometo de 3 – (4,5 – dimetiltiazol – 2 – il) tetrazólio]
Na ⁺	Sódio
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
PA	Para Análise
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PG	Prostaglandina
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
TGI	Trato Gastrointestinal
TGO	Transaminase Glutâmica Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmica Pirúvica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRPV1	Receptor de Potencial Transitório Vaniloide 1
TXA ₂	Tromboxano A ₂

VIP	Peptídeo Intestinal Vasoativo
v.o.	Via Oral
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µmol	Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Dor e Nociceção.....	15
1.2 Inflamação.....	18
1.3 Plantas medicinais como terapia complementar.....	22
1.4 Considerações sobre a espécie <i>Punica granatum</i>.....	25
2 OBJETIVOS.....	27
2.1 Objetivo geral.....	27
2.2 Objetivos específicos.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Substâncias.....	28
3.3 Coleta e identificação da espécie.....	29
3.4 Preparação do extrato.....	29
3.5 Ensaio de viabilidade celular.....	30
3.6 Ensaio de toxicidade aguda.....	31
3.7 Avaliação fitoquímica.....	31
3.7.1 Alcaloides.....	31
3.7.2 Taninos.....	31
3.7.3 Flavonoides.....	32
3.7.4 Saponinas.....	32
3.7.5 Antraquinonas.....	32
3.8 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético.....	33
3.9 Teste do campo aberto.....	33
3.10 Ensaio da placa quente.....	34
3.11 Ensaio de nociceção induzida por formalina.....	35
3.12 Nociceção induzida por glutamato.....	36
3.13 Ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.....	36
3.14 Análise estatística.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor e Nociceção

A dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano” (TRACEY; MANTYH, 2007). Considerado como um mecanismo de proteção, é definida como uma experiência consciente influenciada por memórias emocionais, patológicas, genéticas e fatores cognitivos (NOEL et al., 2012; ROY et al., 2009). Com a possibilidade de minimizar o prejuízo físico, a dor fornece um rápido aviso ao sistema nervoso, com o início de uma resposta motora (FEIN, 2012).

Mensurar e classificar a dor se torna complicado por esta ser subjetiva. Um dos meios utilizados para avaliá-la é o temporal, levando em consideração a duração da dor em um determinado espaço de tempo. Dessa forma, é classificada em transitória, aguda ou crônica (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2006). A dor transitória, cuja função é a de proteção ao organismo contra uma possível lesão aos tecidos, ocorre por ativação de nociceptores periféricos independentes da existência de dano tecidual. A dor aguda é ocasionada por diversos tipos de lesões teciduais como escoriações e processos invasivos, através da estimulação direta de nociceptores, conexões nervosas do sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso autônomo (SNA). Nestes casos, a dor ocorre por um tempo determinado e alerta sobre uma alteração no processo de homeostasia do organismo (LOESER; MELZACK, 1999; MILLAN, 1999).

Em algumas situações, quando o organismo não consegue produzir mecanismos para resolução de determinada lesão ou estabelece mecanismos adaptativos inadequados, a dor pode se tornar persistente ou crônica (D’MELLO; DICKENSON, 2008). Consequência de processos inflamatórios crônicos ou estímulos persistentes, a dor crônica se difere das demais por persistir mesmo após a recuperação de determinada lesão, podendo se prolongar por meses ou anos (BARROS, 2006).

A dor crônica representa um grande desafio na atualidade para os profissionais da saúde. Por sua etiologia multifatorial, seu diagnóstico e tratamento são mais complexos, nem sempre alcançando êxito nos resultados. A dor crônica influencia negativamente a qualidade de vida, leva o indivíduo ao sofrimento intenso, depressão, distúrbios do sono, além dos custos socioeconômicos e incapacidades (TRACEY; DICKENSON, 2012).

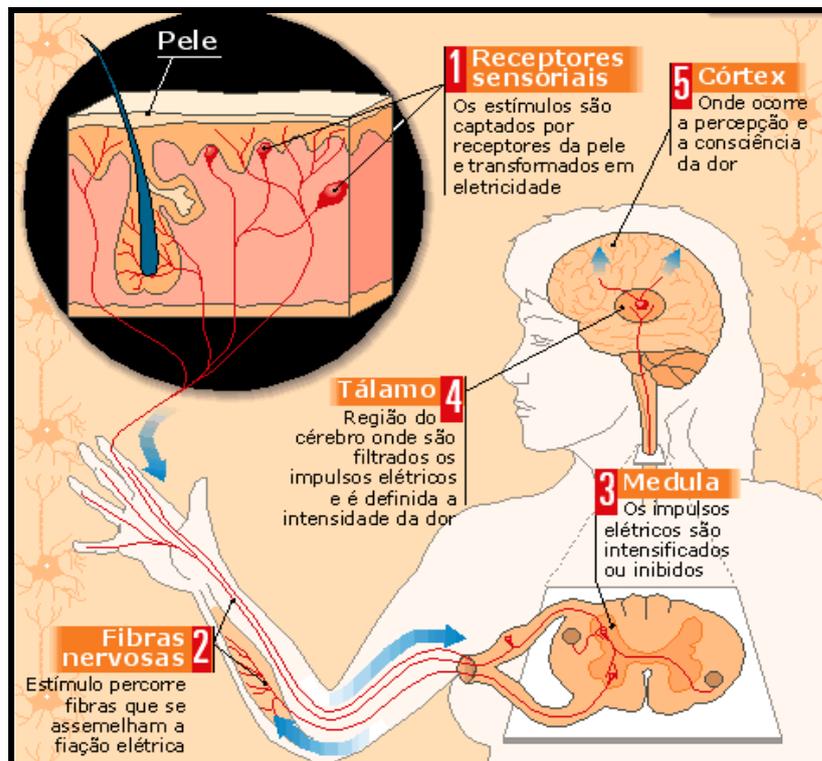
A dor pode ser classificada também por sua origem, que pode ser nociceptiva, inflamatória, ou neuropática. A dor nociceptiva corresponde a uma resposta fisiológica do SNC e periférico a uma lesão tecidual (superficial ou mais profunda) localizada. As dores somática e visceral são exemplos de dor nociceptiva (SALTER, 2005). Ambos os tipos de dor usualmente são tratados por analgésicos opioides e anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Apesar das múltiplas abordagens terapêuticas, o tratamento da dor visceral continua sendo um desafio significativo, ao passo que a dor somática apresenta excelente resposta aos tratamentos existentes (DISTRUTTI et al., 2010). Na dor inflamatória, ocorre uma lesão tecidual que leva à liberação de mediadores inflamatórios que sensibilizam/ativam os neurônios periféricos induzindo, assim, uma resposta nociceptiva que desencadeará a dor. Esses mediadores são liberados tanto por uma lesão tecidual quanto pela presença de algum corpo estranho no organismo (CUNHA, 2009).

A dor neuropática ocorre quando uma lesão afeta diretamente o sistema nervoso (somatossensorial). Sua modulação e geração envolvem mecanismos centrais e periféricos (TREEDE et al., 2008). Este tipo de dor é comum, podendo ser iniciada após lesão nervosa, infecções, uso de alguns medicamentos ou associada à algumas doenças, como por exemplo, o câncer (SCADDING, 2003). Quando a dor neuropática surge a partir de danos aos nervos periféricos é denominada dor neurogênica. Nesses casos, os analgésicos convencionais não conseguem promover o alívio efetivo da dor (GORMSEN et al. 2010; WETERING et al., 2010).

A nocicepção corresponde a manifestações neurofisiológicas geradas por um estímulo nocivo, enquanto que a dor é caracterizada por uma experiência desagradável que geralmente acompanha a nocicepção (LOESER; TREEDE, 2008). A nocicepção é uma forma especializada de sinalização sensorial, que converte a informação sobre lesões teciduais em sinais dolorosos (**Figura 1**) (CUNHA, 2009).

Os neurônios responsáveis pela transmissão da dor são os nociceptores e alertam o organismo sobre um possível dano. Após a ativação, os nociceptores sofrem alterações na membrana, o que deflagra potenciais de ação que serão transmitidos ao SNC através da medula espinal e posteriormente interpretado como sensação dolorosa no córtex cerebral (TRACEY; DICKENSON, 2012; MEYER, 2008).

Figura 1 – Transmissão da dor nociceptiva: da captação do estímulo por receptores sensoriais ao percurso e processamento da dor em nível central



Fonte: Fernandes, 2013.

Os nociceptores são classificados principalmente em fibras aferentes mielinizadas ($A\delta$) que conduzem mais rapidamente o impulso nervoso; $A\beta$ – que respondem a estímulos mecânicos inócuos) e as aferentes não-mielinizadas (fibras C polimodais - de baixa condutância) (BASBAUM et al., 2009). Esses nociceptores são encontrados na pele, musculatura esquelética, articulações, vísceras (JULIUS; BASBAUM, 2001). Os nociceptores que inervam o corpo possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios das raízes dorsais (GRD), enquanto os que estão na face estão localizados no gânglio trigeminal (MEYER, 2008).

As fibras nervosas aferentes primárias são as responsáveis por detectar estímulos ambientais térmicos, mecânicos ou químicos e transduzir essas informações em corrente elétrica (BASBAUM et al., 2009). Os receptores de potencial transitório (TRP) constituem o maior grupo de detectores de estímulo nocivos (CHENG; JI, 2008; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009).

Os mediadores inflamatórios que participam no processo de ativação dos nociceptores são a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, leucotrienos (LT), fator de ativação plaquetária (PAF), prostaglandinas (PG), tromboxanos, interleucinas (IL), fator de necrose

tumoral alfa (TNF- α), fator de crescimento neuronal (NGF) e serina proteases (VERGNOLLE, 2008).

Na ocorrência de uma lesão tecidual e consequente liberação e interação dos mediadores químicos locais com seus respectivos receptores é desencadeado um processo de transmissão do estímulo doloroso até o alcance em níveis centrais (MARCON, 2009). Após essa sensibilização dos nociceptores periféricos e geração dos potenciais de ação, são liberados vários neurotransmissores, tais como: substância P, L-glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), colecistocinina 8 (CCK-8), somatostatina e peptídeo do gene calcitonina (CGRP) no corno dorsal da medula espinhal (DA MATTA, 2012).

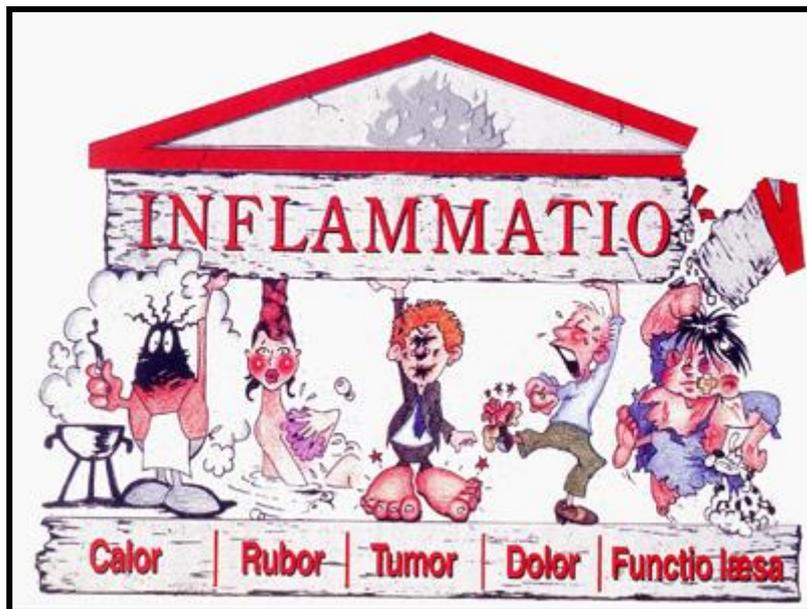
Os neurônios de segunda ordem são, então, ativados pelos neurotransmissores e o sinal segue para as áreas do sistema límbico (tálamo) e córtex cerebral pelo trato espinotalâmico, que compreendem as regiões finais da via nociceptiva. Chegando ao tálamo, o estímulo nocivo passa pelo processo de somatização, informando que existe uma sensação nociceptiva, enquanto no córtex existe o componente emocional que discrimina o tipo de sensação (ROY et al., 2009).

1.2 Inflamação

O processo inflamatório é uma reação de reparação e defesa do organismo ao dano tecidual visando diluir, destruir ou isolar o agente lesivo. A inflamação é uma resposta dos tecidos conjuntivos vascularizados às agressões de diversas naturezas (física, química ou biológica) que induz a liberação de uma gama de mediadores exógenos e endógenos. (KUMMER; COELHO, 2002).

Esta resposta tem as suas desvantagens, pois causa edema, rubor, calor e dor, sinais cardinais da inflamação já descritos por Cornelius Celsus, um médico romano do século I d.C. Tais sinais, de fato, justificam o termo “inflamação”, derivado do verbo latino *inflammare*, o que significa incendiar. Já a perda da função, quinto sinal clínico da inflamação, foi adicionada posteriormente por Rudolph Virchow em 1858 (ALLER et al., 2007; SERHAN; SAVIL, 2005). A **Figura 2** ilustra os cinco sinais característicos da inflamação.

Figura 2 – Sinais característicos da inflamação



Fonte: Dunder, 2009.

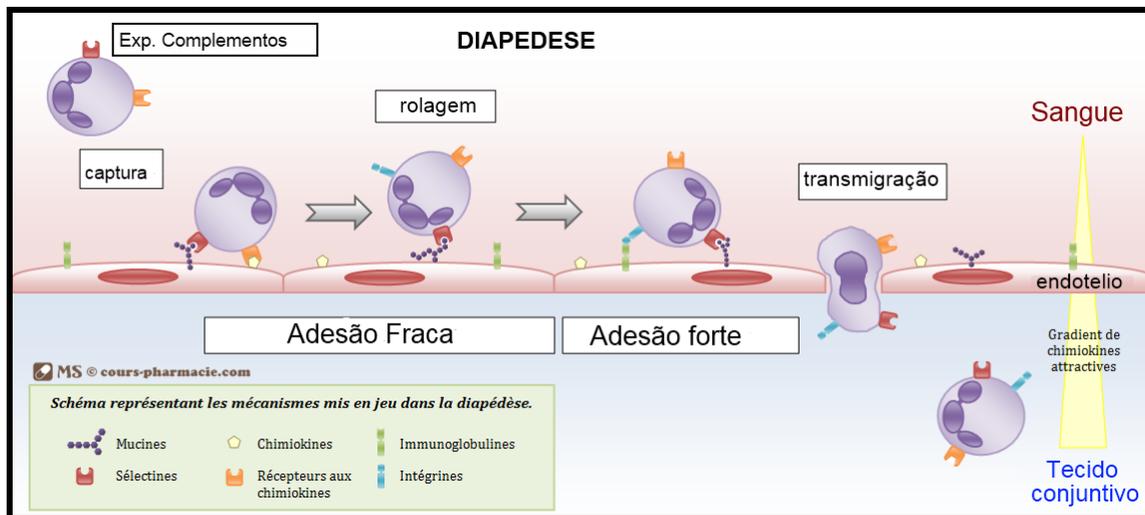
Nota: Ilustração médica da faculdade de medicina de St Bartholomeu.

Após lesão tissular ou infecção, a inflamação consiste na resposta orgânica mais precoce do organismo. Sendo um processo fisiológico, envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão. Na fase inicial da inflamação, observam-se os sinais do calor e rubor que ocorrem devido à vasodilatação periférica e aumento do fluxo sanguíneo. Tais eventos vasculares são mediados principalmente por óxido nítrico (NO) e PG (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; VERGNOLLE, 2008). A formação do edema, ou seja, do extravasamento do exsudato, acontece devido à liberação simultânea de mediadores como a histamina, bradicinina, PAF e LT que aumentam a pressão oncótica e a permeabilidade vascular, fazendo com que os fluidos proteicos (exsudato) passem para o espaço extracelular (GILROY et al., 2004).

Na fase celular, ocorre a quimiotaxia, a transmigração de leucócitos ao longo de um gradiente químico até o local lesionado através de estímulos quimiotáticos (MEDZHITOV, 2008). Neste processo, compreendem as etapas de marginação (movimentação do neutrófilo do centro para a periferia do vaso), rolagem (desaceleração do neutrófilo através da ligação com moléculas de adesão chamadas selectinas), aderência às paredes endoteliais e migração dos leucócitos até o local do tecido lesionado (**Figura 3**) (MARSHALL et al., 2003). Quando o organismo não consegue eliminar o agente agressor por meio da resposta inflamatória aguda, desenvolve-se a fase proliferativa (crônica) da inflamação, que compreende um

processo de longa duração (variando de semanas até anos) que envolve degeneração e fibrose tecidual, exsudato rico em linfócitos e macrófagos (MONTENEGRO; FECHIO, 2010).

Figura 3 – Recrutamento leucocitário no processo inflamatório



Fonte: Adaptado de Cunha, 2011.

Diversos agentes promovem a quimiotaxia, sendo os principais os componentes do sistema complemento (C5a), produtos da via da lipoxigenase (leucotrieno B4 – LTB4), PAF e quimiocinas (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

Após sofrerem estímulos mecânicos, químicos ou físicos, os fosfolípidos de membrana liberam o ácido araquidônico, a partir da ativação da enzima fosfolipase A2 (PLA2). O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado pelas cicloxigenases (COX) produzindo os prostanoídes (prostaglandinas e tromboxanos) e pelas lipoxigenases (LOX) produzindo leucotrienos (BOTTING, 2006).

São conhecidas três isoformas da enzima cicloxigenase, a COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 possui função fisiológica e está presente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins. A COX-2 é induzida por alguns mediadores como IL-1 e TNF- α e é a enzima envolvida nos processos inflamatórios por produzir os prostanoídes (prostaglandinas e leucotrienos). A COX-3 é descrita como uma isoforma encontrada principalmente no SNC, principalmente região do córtex cerebral, medula e também expressa no coração (CHANDRASEKHARAN; DAI; ROOS, 2002; HIKIJI et al., 2008).

Na inflamação, as prostaglandinas envolvidas são: PGE2, PGD2, PGF2 α , PGI2 (prostaciclina) e tromboxano A2 (TXA2). A PGI2 tem ação vasodilatadora e potencializa os efeitos quimiotáticos, além de aumentar a permeabilidade vascular para que outros

mediadores desempenhem seus papéis no local da inflamação. As prostaglandinas PGE₂, PGD₂ e PGF₂ α estão relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular e formação do edema e também possuem ação vasoativa. Além disso, as PG também participam dos processos dolorosos e febris durante a inflamação, como a PGE₂, que torna a pele hipersensível a estímulos dolorosos (PECCHI et al., 2009).

Os LT são produtos derivados do ácido araquidônico, a partir das LOXs, que são enzimas citosólicas, solúveis, encontradas preferencialmente nos pulmões, plaquetas, células endoteliais, monócitos, mastócitos, eosinófilos e linfócitos B (MONTUSHI et al., 2007). O LTB₄ promove quimiotaxia de várias células (neutrófilos, eosinófilos e monócitos), sendo responsável pela migração das mesmas para o tecido lesionado. Além da quimiotaxia, outra função exercida pelos LT é a ativação dos leucócitos e promoção da degranulação, além de produzirem superóxidos, que contribuem para os danos teciduais característicos da inflamação. Outros LT, como LTC₄, LTD₄ e LTE₄, atuam aumentando a permeabilidade vascular (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; WIENECKE, 2008).

O NO, derivado do metabolismo do aminoácido L-arginina, é um gás solúvel que sofre ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produzida pela ativação de leucócitos em condições inflamatórias (VALLANCE; CHAN, 2001). O NO promove o relaxamento vascular, além de inibir o processo de agregação plaquetária e adesão leucocitária, também está envolvido na neurotransmissão e na atividade antimicrobiana e antitumoral dos macrófagos (ZOCCALI, 2007).

Algumas células produzem e liberam outros mediadores importantes no processo inflamatório. É o caso dos mastócitos, basófilos, que liberam histamina. Ela provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, sendo os pulmões, a pele e o trato gastrointestinal (TGI) os locais onde se encontra uma maior concentração. Na pele, a histamina acarreta uma resposta tripla, ocasionando eritema, edema e dilatação associada à vasodilatação indireta via estimulação por reflexos axonais. No TGI a histamina é essencial para a secreção ácida (THURMOND; GELFAND; DUNFORD, 2008).

As citocinas influenciam a ativação, divisão, apoptose e quimiotaxia celular. Elas podem também estar envolvidas na diferenciação celular, na inflamação, na imunidade e no reparo tecidual (PECCHI et al., 2009; HANADA; YOSHIMURA, 2002). As citocinas são classificadas em subgrupos, como: ILs, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia, ou ainda, podem ser classificadas conforme sua atividade

biológica como, por exemplo: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-1RA, IL-4 e IL-10) (WONG; FISH, 2003).

A IL-8, por exemplo, atua como fator quimiotático, atraindo células polimorfonucleares para a o local da inflamação. Neste processo, também estão envolvidas as quimiocinas, que são fundamentais para os leucócitos, pois atuam em seu crescimento, diferenciação e ativação, imprescindíveis para que ocorra quimiotaxia (TOWNSEND; MCKENZIE, 2000).

Apesar das diversas alternativas farmacológicas existentes, é crescente o número de pesquisadores interessados em estudar os mediadores e a fisiopatologia da inflamação, pois os medicamentos que estão atualmente disponíveis no mercado apresentam uma eficácia limitada e/ou possuem efeitos adversos que restringem sua utilização (GRIS et al., 2010). É importante destacar que muitos anti-inflamatórios disponíveis são capazes de induzir lesões gástricas por inibirem a síntese de PGs, o que representa uma importante limitação ao uso desses produtos. Sendo assim, é necessário que as pesquisas continuem na busca por alternativas mais eficazes no tratamento da inflamação (VERGNOLLE, 2008).

1.3 Plantas medicinais como terapia complementar

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de diversas comunidades e grupos étnicos (HOEFFEL et al., 2011). A etnofarmacologia é a disciplina científica que estuda esta relação entre o uso dessas plantas e o homem e que vem se destacando cada vez mais por suas questões ecológicas, ideológicas e biológicas (ALBUQUERQUE, 2002).

Apesar de algumas dificuldades, a etnofarmacologia é uma importante ferramenta na busca de substâncias naturais com ação terapêutica. Para que uma determinada planta se torne um medicamento, deve ser validada e incluída na Farmacopeia, após identificação do seu princípio ativo e evidencição dos seus efeitos farmacológicos. São necessárias duas etapas durante os estudos: estudos farmacológicos pré-clínicos e toxicológicos e isolamento e caracterização do princípio ativo por processo de separação (LORENZI; MATOS, 2008).

Desde o início da humanidade, o homem utiliza plantas como forma de cuidado na recuperação da saúde e para melhorar suas condições de vida. Essa prática evoluiu e hoje são utilizadas tecnologias sofisticadas para fabricação de substâncias puras ou isoladas. Diversas civilizações, como a Egípcia, Greco-Romana e a Chinesa são exemplos na utilização de

recursos naturais para o controle de pragas e mecanismos de defesa. Um exemplo foi a descoberta do veneno de Hemlock (*Conium maculatum* L.) que era utilizado não só para caça, mas também na execução de prisioneiros, como Sócrates, durante o Império Grego (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

As plantas medicinais tornaram-se alvo de interesse para pesquisas científicas. Como consequência, a prática médica beneficiou-se com um novo arsenal terapêutico, como por exemplo, o fármaco ácido acetilsalicílico (AAS), originado da salicina da espécie *Salix alba*. Parte dos medicamentos encontrados atualmente são derivados de vegetais, organismos marinhos, vertebrados e invertebrados terrestres, o que demonstra a importância destas fontes na busca de novos tratamentos para diversas doenças (SOUSA et al., 2008).

No Brasil, a utilização dessa prática estava presente na cultura indígena, posteriormente sofreu influência europeia e africana e continua presente em todas as comunidades atualmente (LORENZI; MATOS, 2008). De todas as plantas e microorganismos existentes na Terra, cerca de 20-22% estão no Brasil e constituem uma imensa fonte de produtos com utilidade terapêutica. Trata-se do país com maior biodiversidade mundial e consequentemente com uma gama de plantas a serem pesquisadas visto a diversidade de biomas, climas e solos que beneficiam variedades vegetais. (CALIXTO, 2005). No entanto, o potencial que o país possui para a descoberta de novos fármacos ainda é pouco explorado, diferente do que ocorre em países como Alemanha, Canadá e Estados Unidos que possuem um alto investimento financeiro em pesquisas na área das plantas medicinais (SOUSA et al., 2008).

A utilização dos fitoterápicos e plantas medicinais permite a ampliação do acesso da população a opções terapêuticas, apresenta-se como importante instrumento para o cuidado de enfermagem e dos outros profissionais da saúde, além de valorizar o conhecimento popular. Sendo considerada parte fundamental nas políticas públicas, a utilização destes métodos é recomendada pela Organização Mundial de Saúde, visto que 80% da população utilizam esse recurso nos seus cuidados básicos de saúde e cerca de 67% das espécies são originadas de países em desenvolvimento (BRASIL, 2006).

A utilização de plantas medicinais faz parte da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos desde 2006. Um dos objetivos da referida Política é a inserção da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) com segurança, uso racional, eficácia e qualidade. Apesar deste estímulo e da riqueza da flora, os estudos científicos são insuficientes (BRASIL, 2007).

O uso de plantas medicinais e fitoterápicos é fonte de inovação em saúde e amplia as opções terapêuticas do SUS, garantindo melhoria na atenção ao cuidado em saúde na perspectiva da integralidade (BRASIL, 2007). O enfermeiro, como parte da equipe de saúde e possível incentivador do uso de plantas medicinais durante a consulta de enfermagem, deve estar respaldado cientificamente para indicação desta prática para a comunidade (FRANÇA et al., 2008). O uso de plantas medicinais pelas famílias tem por finalidade prevenir doenças, tratar e/ou aliviar sintomas. Cada grupo familiar ou comunidade possui um conhecimento próprio que é repassado entre as gerações e a utilização de plantas medicinais como forma de cuidado em saúde faz parte deste contexto (CEOLIN et al., 2011).

A integração entre o conhecimento popular e o conhecimento científico é indispensável, e o enfermeiro participa deste processo contribuindo com as ciências da saúde, estimulando a autonomia dos indivíduos e das comunidades para o cuidado em saúde, ampliando a visão de integralidade (CEOLIN et al., 2011).

Antes de serem indicadas, as plantas precisam ser estudadas, pois a aplicação indiscriminada pode aumentar o risco de morbimortalidade pelos efeitos adversos e toxicidade presentes. O profissional da saúde deve conhecer a planta, identificar seus princípios ativos, indicações e contraindicações, considerando sempre o conhecimento local e a diversidade de nomes que a população atribui a cada espécie (WONG, 2003; CEOLINE et al., 2011). Um dos maiores cuidados que devem ser difundidos sobre o uso de plantas medicinais é durante a gravidez, pois alguns constituintes podem ultrapassar a placenta e causar efeito teratogênico, embriotóxico e abortivo. Isso ocorre pelo fato de muitos acreditarem que produtos de origem vegetal não apresentam reação adversa ou efeitos tóxicos (RODRIGUES et al., 2011).

Uma pesquisa realizada com 50 famílias de uma área de abrangência da Estratégia de Saúde da Família do Município de Cascavel-PR, 100% dos entrevistados afirmaram utilizar plantas como medicamentos sem orientação médica e confirmaram a confiança caso fossem orientados pela equipe de saúde da família sobre esta prática, 92% relataram seguir orientação de parentes e amigos e cerca de 54% não tinham certeza da dosagem a ser utilizada (TOMAZZONI et al., 2006).

Em Alagoas, um outro estudo foi realizado no município de Arapiraca e verificou-se que na feira livre são comercializados cerca de 100 plantas medicinais, originadas da caatinga e floresta atlântica. De acordo com a pesquisa, 66% da utilização é na forma de chá, seguida por garrafadas (9%), lambedores (6%), banhos (6%), pó (4%), alimentação (4%) e outros (5%). As cascas do fruto representaram 24% das partes utilizadas (LÓS et al., 2012).

Apesar da biodiversidade e de políticas de incentivo à utilização de plantas medicinais na promoção à saúde, os estudos ainda são precários no Brasil. Dessa forma, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas para enriquecer o conhecimento dos profissionais de saúde e da população, assegurando a eficácia dessa prática no SUS, garantindo a integralidade da assistência e a participação social.

1.4 Considerações sobre a espécie *Punica granatum* L.

Um das plantas utilizadas pela comunidade como medicinal é a *Punica granatum* (**Figura 4**), conhecida popularmente como romã, romãzeira, romãzeiro, romeira, granada, milagrada, milagreira, miligrã, romeira-de-granada ou miligrama. Originada da Ásia, está presente em todas as regiões do Mediterrâneo e no Brasil. É um arbusto lenhoso, ramificado, da família Punicaceae. Apresenta folhas pequenas, rijas, brilhantes e membranáceas, flores vermelho-alaranjada dispostas nas extremidades dos ramos, originando frutos esféricos, com muitas sementes em camadas as quais se acham envolvidas em arilo polposo (LORENZI; SOUZA, 2001; FERREIRA, 2004). Na literatura etnofarmacológica, há referência do uso do pericarpo (parte externa do fruto) para o tratamento de inflamações na boca e garganta, além do suco contra catarata, porém, apenas com base na tradição (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 4 – Frutos da espécie *Punica granatum*



Fonte: Autora, 2014.

Em algumas culturas, a romã é considerada sagrada e simboliza sanidade, fertilidade e abundância. No budismo, a romã representa a essência de influências favoráveis. Na cultura japonesa, ela é conhecida como estimulante à fertilidade. Na China e no Islamismo, tem um

papel como símbolo de fertilidade e abundância. No Cristianismo, representa ressurreição, vida eterna e fertilidade, além do potencial para tratar de várias doenças (LANGLEY, 2000).

Diversas partes da *P. granatum* são utilizadas no tratamento de diversos processos patológicos em várias regiões do mundo. Inflamações, reumatismo, dores de garganta e agente vermífugo, além de ação contra o Diabetes, metrorragias e diarreia são alguns exemplos da utilização da romã há séculos no oriente médio, Índia e China. (ARUN; SINGH, 2012).

A infusão da casca do fruto da *P. granatum* é indicada popularmente para o combate a inflamações agudas. É utilizada para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias, dentre elas infecções genitais, urinárias e inflamações no trato respiratório, sendo utilizada sua folha, flor e casca do fruto (COSTA, 2011). Estudos demonstram a presença de compostos que inibem a ação inflamatória por supressão da biossíntese de prostaglandinas. Análises fitoquímicas registram presença de alcaloides, taninos e ácido punícico. Esses compostos foram obtidos principalmente através das sementes. Foram encontrados compostos fenólicos como: antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos e taninos. São relatadas atividades antimicrobianas, cicatrizante e anti-diabética (ARUN; SINGH, 2012). Estudos mostraram que compostos fenólicos apresentaram ação anti-inflamatória e atenuação de fatores aterogênicos. Flavonoides extraídos da polpa do fruto inibiram enzimas oxidantes, ciclooxigenase e lipooxigenase. A literatura apresenta pesquisas sobre os efeitos antitumorais do fruto e folha (OLIVEIRA et al., 2010) e antibacterianos da casca do fruto (SILVA et al., 2008).

A romã faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS – RENISUS, lista que orienta estudos e pesquisas para subsidiar a elaboração de fitoterápicos e orientação de plantas medicinais a serem disponibilizadas para uso da população. A pesquisa por fitoterápicos e plantas medicinais seguras é fundamental, uma vez que se houver ação tóxica comprovada, faz-se necessário divulgar o resultado para quem tradicionalmente a utiliza.

Diante dos resultados obtidos em estudos anteriores sobre as ações farmacológicas da *P. granatum* e a necessidade de aumentar o conhecimento sobre suas aplicações nas terapias complementares, foi direcionado para a avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico da casca do fruto de *Punica granatum* (EEPG).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico da casca do fruto de *Punica granatum* (EEPG).

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade (*in vivo* e *in vitro*) do EEPG;
- Investigar os componentes fitoquímicos presentes no EEPG;
- Investigar o potencial antinociceptivo do EEPG;
- Analisar o efeito do EEPG sobre atividade locomotora no ensaio de campo aberto.
- Avaliar o potencial anti-inflamatório do EEPG;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *Swiss* (20 - 35 g) de ambos os sexos, com seis a dez semanas de idade em todos os experimentos, com exceção do ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund, no qual foram utilizados ratos *Wistar*, pesando entre (150 – 200 g), de ambos os sexos, adultos com 5 a 8 semanas. Tanto os ratos, quanto os camundongos, foram obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Foram utilizados grupos com seis animais, tratados com extrato etanólico de *Punica granatum* (EEPG), fármacos padrões ou veículos. Os animais foram mantidos em jejum por oito horas antes do início dos experimentos com livre acesso à água, ciclo claro-escuro de 12 horas, temperatura de $21 \pm 2^\circ \text{C}$ e sistemas de ventilação adequados.

Todos os animais utilizados neste trabalho foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UFAL (Protocolo nº 03/2013). Os ensaios farmacológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

3.2 Substâncias

Para realização dos experimentos foram utilizados: ácido acético 0,6%, na dose de 10 mL/kg, intraperitoneal (i.p.); formaldeído 36% (VETEC) diluído em solução fisiológica 0,9% até obtenção de formalina a 2,5%, subplantar; carboximetilcelulose - CMC (Sigma), Tween 80[®] (2%, Sigma); ácido glutâmico (Sigma), na dose de 30 µmol/pata; e adjuvante completo de Freund (Sigma), na dose de 100 µL/animal, via intradérmica. Como fármacos padrões foram utilizados: Dipirona (Pharmanostra) suspensa em CMC com auxílio de Tween 80[®] (dispersante), na dose de 10 mL/kg, via oral (v.o.); sulfato de morfina (Cristália) na dose de 5 mg/kg, i.p., e diazepam (DZP, Cristália), 1,5 mg/kg, i.p., ambos diluídos em solução fisiológica 0,9%. O EEPG foi diluído em água destilada, e administrado na dose de 10 mL/kg, v.o. Os animais controle foram tratados com veículo (água destilada) nessa mesma dose e via.

3.3 Coleta e identificação da espécie

As cascas do fruto da planta *P. granatum* (**Figura 5**) foram coletadas no mês de junho de 2012, na cidade de Maragogi, Estado de Alagoas, à latitude de 09° 53' 75" S, longitude de 35° 13 h 20' 05" O, a aproximadamente 133 km ao norte de Maceió.

A identificação botânica foi realizada no Setor de Botânica do ICBS-UFAL pela bióloga e Profa. Dra. Letícia Ribes de Lima, sendo a exsicata depositada no herbário da Universidade Federal de Alagoas.

As cascas foram separadas, higienizadas, pesadas e posteriormente acondicionadas em um recipiente hermeticamente fechado e identificado, onde permaneceu até o momento do preparo do extrato.

Figura 5 – Cascas do fruto de *Punica granatum*

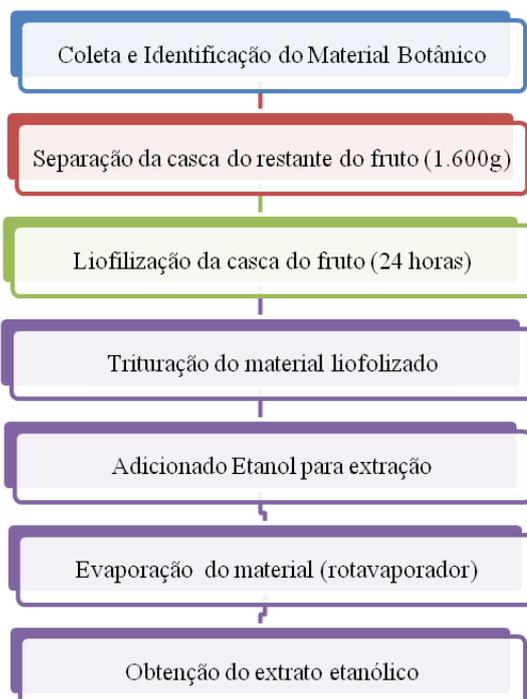


Fonte: Autora, 2014.

3.4 Preparação do extrato

O extrato etanólico foi obtido a partir 1600 gramas de cascas do fruto da *P. granatum* as quais foram submetidas à liofilização (ThermoSavant micromodulyo) por 24 horas e trituradas, de onde então foi adicionado etanol PA (aproximadamente 1,5 litros). O pó permaneceu no etanol por três dias. O conteúdo foi filtrado em papel de celulose e adicionado mais etanol até que o líquido atingisse a coloração mais clara que a da partida. O conteúdo final foi evaporado em rotaevaporador por 24 horas, resultando em 65 gramas de extrato (**Figura 6**).

Figura 6 – Esquema do processo de obtenção do EEPG



Fonte: Autora, 2014.

3.5 Ensaio da viabilidade celular

Para o ensaio da viabilidade celular, foram plaqueados em placa de 96 cavidades, macrófagos da linhagem J774 na densidade de 2×10^5 células por poço cultivados em meio DMEM (meio Dulbecco modificado por Eagle) suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foi adicionado 200 μL do meio com as células em cada cavidade. As células foram tratadas com EEPG nas concentrações de 100, 10 e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 48 h e mantidas em estufa a 5% de CO_2 . Uma hora antes de adicionar o MTT, três poços foram lisados com 2 μL de Triton 100X para comparação de morte celular. Após o período de incubação total (48 h), o sobrenadante foi descartado e adicionado em cada cavidade 100 μL de uma solução de MTT (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e reincubadas por 1 h em estufa a 37° C e a 5% de CO_2 . Após esse período, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspensionado com 100 μL de dimetilsulfóxido (DMSO).

Para a quantificação do sal de formazan reduzido, as placas foram lidas com o auxílio de um leitor de microplacas no comprimento de onda 550 nm. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade celular e o estado metabólico da célula a partir da redução do sal de tetrazólio (coloração amarela) a formazan (coloração azul escuro), sendo bastante útil para avaliar a citotoxicidade (MOSMANN, 1983).

3.6 Ensaio de toxicidade aguda

Este ensaio foi realizado como descrito por Almeida et al. (1999) com pequenas modificações. Dois grupos com 6 camundongos *Swiss* cada (6 machos e 6 fêmeas) foram tratados com EEPG nas doses de 500 e 1000 mg/kg, por v.o. e o terceiro grupo (controle) foi tratado com veículo (água destilada). Caso houvesse morte de mais de um camundongo, seriam utilizadas outras doses para determinação de DL₅₀ (dose que mata 50% dos animais em experimentação). Durante as primeiras 24 horas, nos tempos de 0, 15, 30 e 60 minutos e diariamente por um período de 14 dias após o tratamento com EEPG, foram observados os seguintes parâmetros: alterações na locomoção, sonolência, piloereção, diarreia, hiperexcitabilidade, convulsões e morte, além do consumo médio de ração e variação de peso dos animais. Ao final do período de observação, os animais foram sacrificados e dissecados para análise macroscópica.

3.7 Avaliação Fitoquímica

A avaliação fitoquímica como base nas pesquisas com plantas medicinais é utilizada para identificação dos compostos químicos nas espécies vegetais (FALKENBERG; SANTOS, SIMÕES, 1999). Conforme dados já encontrados na literatura (ARUN; SINGH, 2012), o EEPG contém as seguintes classes de constituintes químicos: alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas e taninos. Testes qualitativos demonstram a presença ou ausência do constituinte químico em questão (COSTA, 2011).

3.7.1 Alcaloides

Foram adicionados 2 mL de solução de ácido clorídrico (HCl) a 1,0 g de EEPG (diluído em 2 mL de metanol) e a mistura foi aquecida por 10 minutos. Após resfriar, a solução foi filtrada e dividida em três tubos de ensaio. Posteriormente, foram adicionadas gotas do reativo de reconhecimento Dragendorff ou gotas do reativo de Mayer nos tubos. Caso houvesse precipitado no fundo do tubo de ensaio, a planta teria a presença de alcaloides (BARBOSA et al., 2004).

3.7.2 Taninos

Um grama de EEPG foi diluído em 2 mL de metanol e posteriormente foram adicionados, à mistura, 5 mL de água destilada. Após filtração, foram adicionadas 5 gotas de solução de cloreto férrico a 10%. Caso houvesse a formação de coloração azul, havia presença de taninos hidrolisáveis e coloração verde, a presença de taninos condensados (BARBOSA et al., 2004).

3.7.3 Flavonoides

Em tubo de ensaio, 1,0 g de EEPG foi diluído em 2 mL de solução metanólica. Foram adicionados quatro fragmentos de fitas de magnésio nas soluções. Posteriormente, foi adicionado ácido clorídrico concentrado. A mudança da cor da solução da substância para vermelho ou castanho, significa a presença de flavonoides (BARBOSA et al, 2004).

3.7.4 Saponinas

Um de EEPG foi adicionado a 2 mL de metanol. Posteriormente, foram adicionados 5 mL de água fervente. Após o resfriamento, a solução foi agitada e mantida em repouso por 20 minutos. A presença de espuma após o processo indica a presença de saponinas no extrato (BARBOSA et al., 2004).

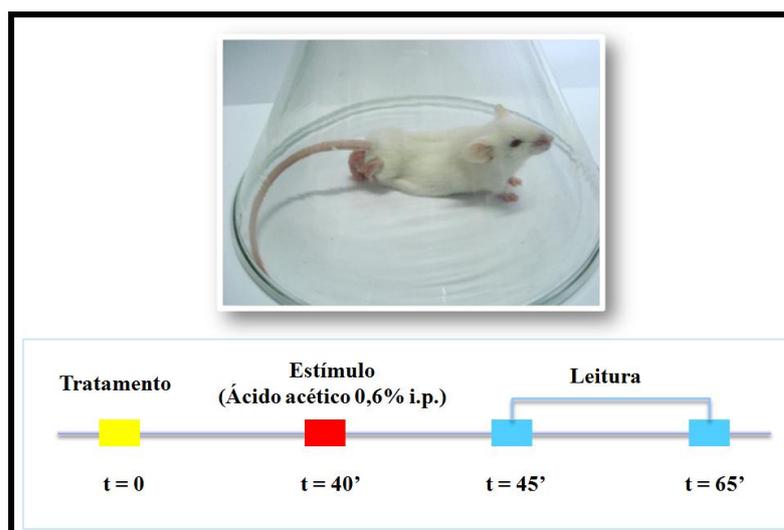
3.7.5 Antraquinonas

Um grama de extrato foi adicionado a 2 mL de metanol. Posteriormente, a solução foi filtrada e foram adicionados à mistura 2 mL de ácido sulfúrico, a qual foi mantido em banho-maria por um minuto. Após o resfriamento, foi realizada a extração em um funil de separação com 10 mL de acetato de etila por duas vezes. A formação de coloração amarela indica a presença de antraquinonas de forma reduzida e vermelha, de antraquinona de forma oxidada (BARBOSA et al., 2004).

3.8 Ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético

Neste ensaio, a nocicepção foi induzida pelo ácido acético 0,6%, que atua como um estímulo nocivo quando injetado na cavidade peritoneal do camundongo. A resposta do animal ao estímulo foi representada por uma sequência de contrações da musculatura abdominal, acompanhadas ou não da extensão dos membros inferiores (**Figura 7**). Quarenta minutos antes da administração do ácido acético (i.p.), os animais foram tratados com EEPG (nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg, v.o.), veículo ou dipirona (40 mg/kg, v.o.), fármaco padrão. Cinco minutos após a administração do agente flogístico, foram registrados o número de contorções abdominais produzidas pelo animal durante 15 minutos (COLLIER et al., 1968).

Figura 7 – Contorção abdominal induzida por ácido acético



Fonte: Autora, 2014.

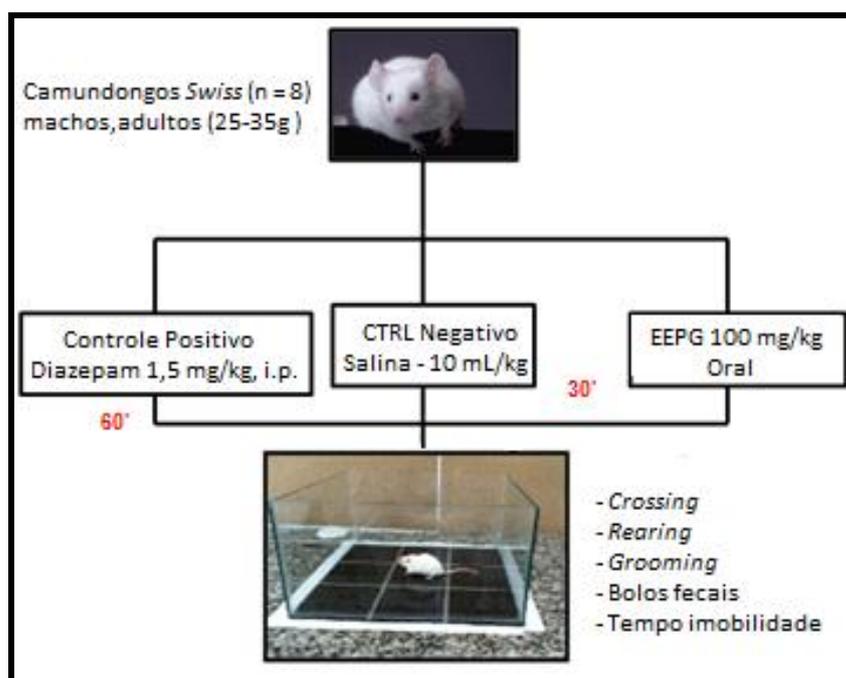
Nota: quarenta minutos após o tratamento (v.o.) com EEPG ou dipirona ou veículo, o estímulo flogístico foi administrado (ácido acético, 0,6%, i.p.), e após 5 minutos foram registrados os números de contorções abdominais pelo animal.

3.9 Teste do campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena de vidro, em cuja base retangular, há nove demarcações na qual se permite avaliar a atividade exploratória e comportamental dos animais. Neste teste, os animais foram colocados individualmente voltados a uma das paredes do campo 40 minutos após o tratamento com EEPG (100 mg/kg, v.o.) ou veículo e 60

minutos após administração i.p. de diazepam (1,5 mg/kg), foram observados durante 5 minutos, com um minuto de adaptação prévia: (1) o número de comportamentos de autolimpeza (*grooming*), (2) de autolevantar (*rearing*), (3) o número de passagens entre os quadrantes da arena (*crossing*), (4) número de defecação, oriunda da estimulação autonômica, e (5) o tempo de imobilidade (**Figura 8**) (CRUSIO; SCHWEGLER, VAN-ABEELLEN, 1989).

Figura 8 – Teste do Campo Aberto



Fonte: Autora, 2014.

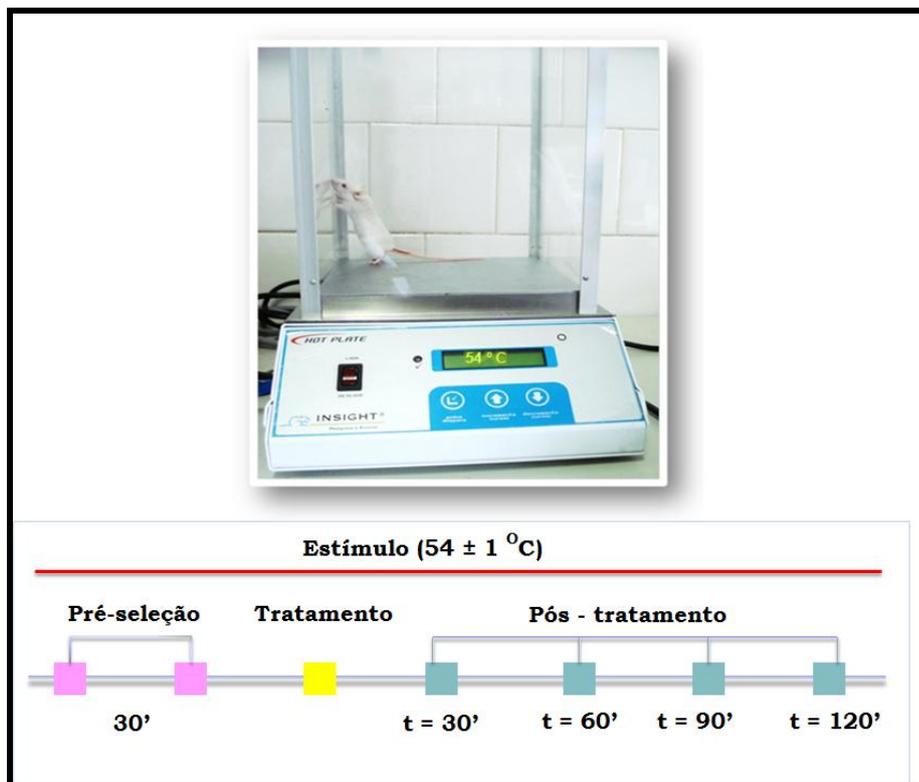
3.10 Ensaio de placa quente

O ensaio da placa quente é considerado um teste sensível a fármacos que atuam em nível supraespinal de modulação da resposta dolorosa (YAKSH; RUDY, 1977).

A atividade antinociceptiva central do EEGP foi avaliada utilizando o ensaio de placa quente. Os camundongos foram colocados em uma placa aquecida a $54 \pm 1,0$ °C e suas respostas ao estímulo térmico foram cronometradas (tempo em segundos) como a latência à lambida, levantamento ou mordida em uma de suas patas dianteiras ou traseiras (**Figura 9**). Foi realizada uma pré-seleção com os animais, no qual foram registradas duas medidas em intervalos de 30 minutos, estabelecendo-se o tempo de corte (máximo de permanência do animal na placa) de 15 segundos. Posteriormente, os animais foram tratados com EEGP (100

mg/kg, v.o.), veículo ou morfina (5 mg/kg, i.p.), fármaco padrão. Após um intervalo de 30 minutos, foi registrado o tempo de latência do animal em intervalos de 30 minutos durante 2 horas (KURAISH et al., 1983).

Figura 9 – Teste da placa quente



Fonte: Autora, 2014.

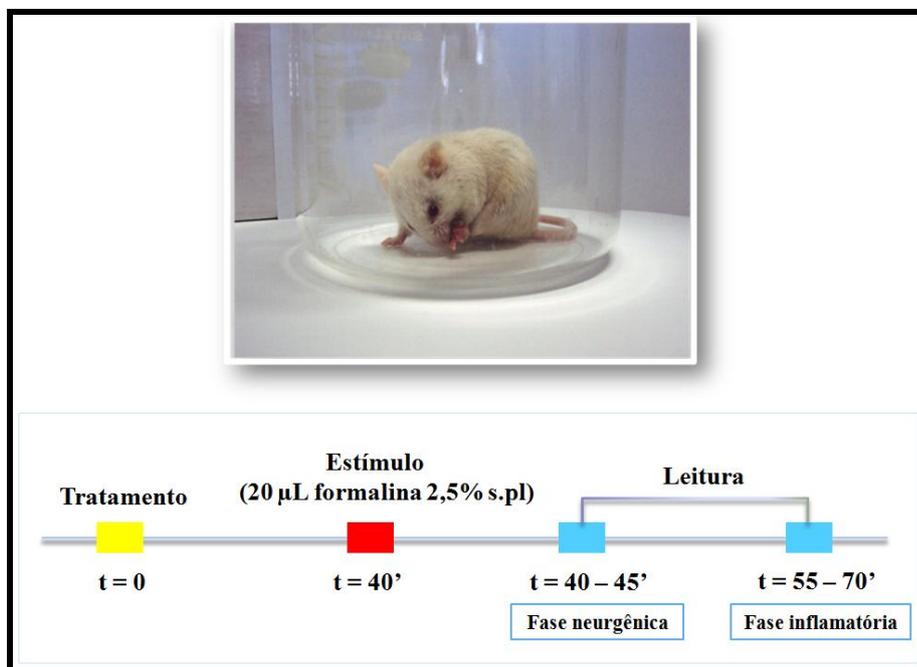
Nota: antes dos tratamentos, realizou-se uma pré-seleção com animais fim de que se excluísse aqueles que eventualmente apresentassem um limiar abaixo ou acima dos níveis normais. Após isso, os animais foram tratados (v.o.) com EEGP ou veículo, ou morfina (i.p.) e avaliados nos tempos 30', 60', 90' e 120'.

3. 11 Ensaio de nociceção induzida por formalina

Neste ensaio, os camundongos receberam uma injeção subplantar de 20 μ L de formalina (2,5%) - formaldeído diluído em solução fisiológica 0,9% - na face dorsal da pata traseira, quarenta minutos após o tratamento com EEGP (100 mg/kg, v.o.), veículo ou morfina, (5 mg/kg, i.p.), fármaco padrão (**Figura 10**). Após a administração, os animais foram imediatamente colocados individualmente em um béquer onde cronometrou-se o tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata, sendo este considerado como indicativo de nociceção. Os primeiros cinco minutos cronometrados representam a fase neurogênica do

teste e após um intervalo de 10 minutos, tem-se a fase inflamatória com duração de 15 minutos, totalizando 30 minutos de ensaio (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Figura 10 – Teste de nociceção induzida por formalina



Fonte: Autora, 2014.

Nota: após o tratamento (v.o.) com EEGP ou veículo, ou morfina (i.p.), foram administrados 20 µL de formalina 2,5%, subplantar em cada animal, os quais foram imediatamente avaliados quanto ao tempo de lambida da pata nas fases neurogênica e inflamatória.

3. 12 Nociceção induzida por glutamato

Neste ensaio, os camundongos foram tratados com 100 mg/kg de EEGP, veículo ou 5 mg/kg morfina, 40 minutos antes da administração de 20 µL de glutamato (30 µmol/pata) na superfície ventral da pata traseira dos camundongos. Os mesmos foram observados por 15 minutos após a administração de glutamato e o tempo em que eles permaneciam lambendo a pata foi registrado como indicativo de nociceção (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

3.13 Ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund

Este ensaio consistiu da administração de 100 µL de adjuvante completo de Freund (mistura viscosa sem cor constituída de 85% de óleo mineral, 15% de emulsificante com 500 µg de Mycobacterium tuberculosis inativada por mililitro de emulsão - 1 mg/mL) por via intradérmica na face dorsal da pata do rato. O tempo total de experimento foi de 21 dias.

No dia 0 os animais foram pesados, as patas medidas e realizada a indução de artrite. A partir do 14º dia, os animais foram tratados com veículo (v.o., 10 mL/kg), ou EEPG 100, 300 e 500 mg/kg (v.o.), ou dexametasona (v.o., 2 mg/kg) e mantidos até o 21º dia (NEWBOULD, 1963). No 22º, os animais foram eutanasiados e o baço e o estômago foram removidos de cada animal. Os baços foram pesados e os estômago foram analisados em uma lupa quanto a possíveis lesões gástricas seguindo os scores: 0,5 – vermelhidão; 1,0 – pontos ulcerosos; 1,5 – estrias hemorrágicas; 2,0 – úlceras ≤ 5 ; úlceras > 5 . A pontuação média de cada grupo tratado, menos a média da pontuação do grupo controle, foi considerado como índice de gravidade de lesão da mucosa gástrica (CIOLI et al., 1979).

3.14 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e as diferenças entre as médias foram analisadas estatisticamente empregando-se a análise de variância (ANOVA) One-way seguido do pós-teste de Dunnet. Valores de $p < 0,05$ representaram que diferenças entre os grupos tratados, comparados ao controle, foram consideradas significantes. A DI_{50} (dose de uma substância capaz inibir 50% do efeito gerado por outra substância) foi calculada por regressão não linear. As análises foram realizadas no GraphPad Prism[®] versão 5.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

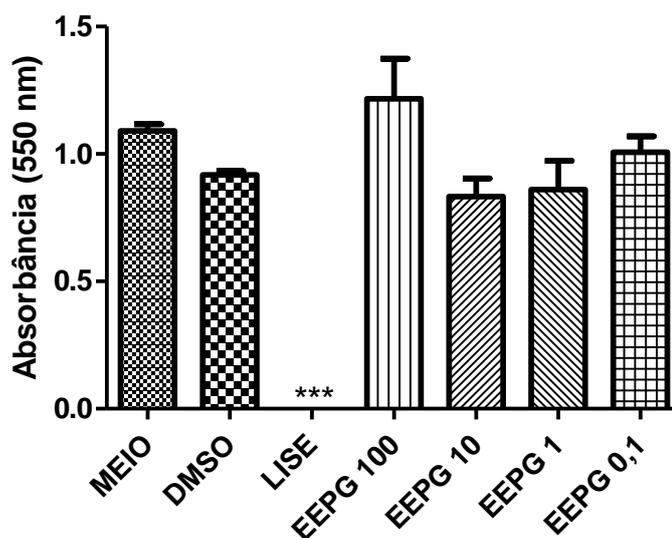
Inicialmente foi investigado um possível efeito tóxico do EEPG, tanto em nível celular, quanto *in vivo* em camundongos *Swiss*. Para avaliar o possível efeito citotóxico foi utilizado o ensaio de viabilidade celular pelo método de MTT.

O ensaio de viabilidade celular constitui o primeiro passo para a avaliação da compatibilidade biológica de uma substância. Esse teste fornece elementos essenciais para análise de biocompatibilidade dos diferentes materiais.

O método de MTT baseia-se na medida do dano induzido por substâncias no metabolismo celular, usualmente pela avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do sal de MTT à formazan pela atividade daquelas enzimas. Desta forma, a redução do MTT a formazan, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (MOSMANN, 1983).

Os resultados obtidos, conforme mostra **Gráfico 1**, demonstraram que não houve redução da viabilidade celular dos grupos tratados com as concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL EEPG em comparação com o grupo controle. Para que determinado produto seja aprovado no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, não deve ocasionar a morte celular ou afetar suas funções (Rogerio et al., 2003). Não foram constatados neste estudo sinais de citotoxicidade para o EEPG.

Gráfico 1 – Efeito do EEGP no ensaio de MTT



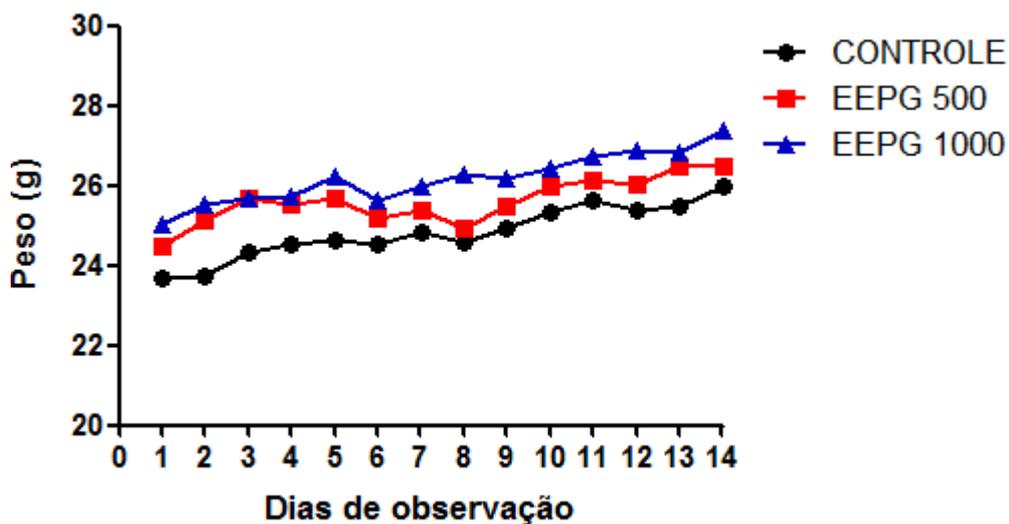
Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos tratados comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnett, onde foram considerados significativos quando $**p < 0.01$ e $***p < 0,001$.

Após a análise da citotoxicidade, foi avaliada a toxicidade aguda. O objetivo da avaliação da toxicidade é determinar o potencial de novas substâncias e produtos causar danos à saúde humana. Os ensaios são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004 que determina o “guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica: identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta (PURCHASE et al., 1998; BLAAUBOER, 2003).

O EEGP mostrou baixa toxicidade evidenciada pela ausência de sinais clínicos (alterações na locomoção, sonolência, piloereção, diarreia, hiperexcitabilidade, convulsões e morte, além do consumo médio de ração e variação de peso dos animais) relevantes no *screening* toxicológico. Não houve mortes e nem foram observadas alterações comportamentais dos animais avaliados. Além disso, não houve diferença estatística significativa entre os pesos dos grupos durante as duas semanas de observação (**Gráfico 2**) bem como do consumo médio de ração pelos mesmos (**Gráfico 3**). O acompanhamento da massa corporal do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância, uma vez que esta pode levar ou não a um dano direto às etapas no processo

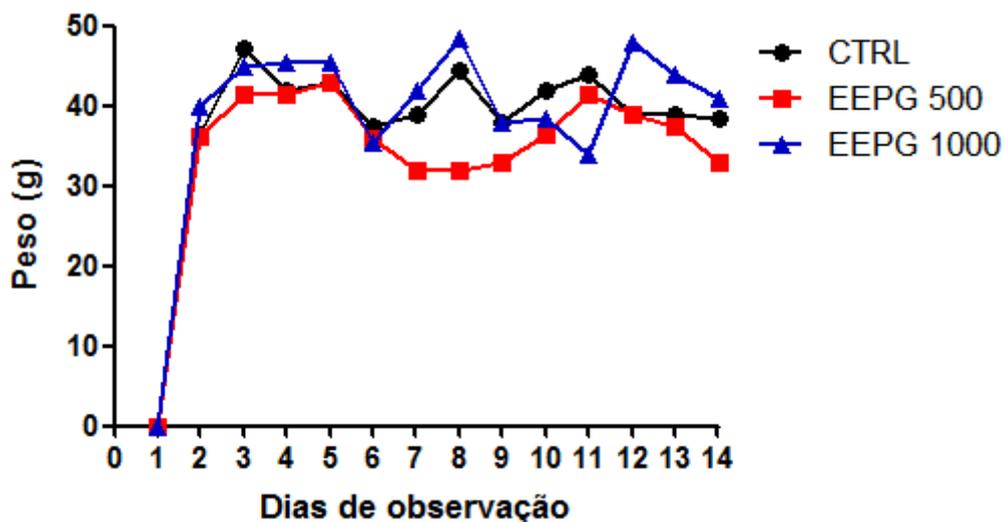
digestivo ou absorptivo, bem como em sinais aferentes cerebrais que possam aumentar ou diminuir o apetite dos animais (IATSYNO et al., 1978).

Gráfico 2 – Média dos pesos dos camundongos durante tratamento agudo com EEGP



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos pesos dos grupos tratados com EEGP (500 e 1000 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.) através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnett.

Gráfico 3 – Consumo médio de ração durante tratamento agudo com EEGP



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos pesos dos grupos tratados com EEGP (500 e 1000 mg/kg, v.o.) ou veículo (10 mL/kg, v.o.) através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnett.

No 15º dia os animais foram eutanasiados e dissecados para análise macroscópica do estômago, fígado, rins e pulmão. Durante esta análise, não foi observada alteração morfológica macroscópica.

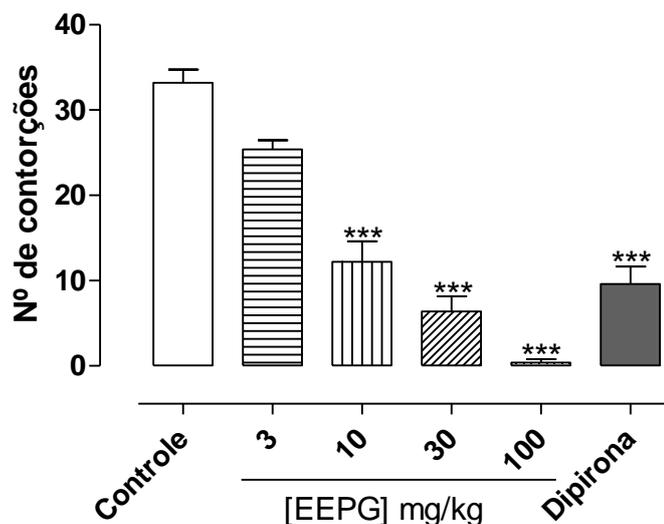
A avaliação da toxicidade aguda demonstrou que *P. granatum* não produziu alterações de importância clínica, indicando que os compostos presentes nesse extrato não produzem efeitos tóxicos. Vidal et al. (2003) demonstraram que os efeitos tóxicos do extrato hidroalcoólico do fruto inteiro de *P. granatum* ocorreram apenas em altas doses com uma DL_{50} de 731 mg/kg (i.p.) em camundongos, sendo a piloereção o sintoma mais evidente. Tal fato pode ser explicado pela diferente composição dos extratos, uma vez que os metabólitos presentes no fruto inteiro podem ser diferentes daqueles contidos apenas na casca do mesmo. O fato do EEPG não ter induzido toxicidade nos animais avaliados permitiu-nos dar continuidade aos estudos farmacológicos com segurança.

Após avaliação da citotoxicidade e da toxicidade aguda foi realizada a avaliação fitoquímica do EEPG. Os ensaios realizados demonstraram a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: flavonoides, saponinas e taninos, semelhantemente ao encontrado por Lima et al. (2012) que analisou cascas e folhas da mesma espécie detectando a presença de alcaloides (e não de saponinas), além flavonoides e taninos também presentes no nosso extrato.

Dando continuidade ao estudo, foram realizados os ensaios para avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato. Os modelos de nocicepção baseiam-se na observação da resposta do animal frente à utilização de estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Neste trabalho, foram utilizados estímulos químicos nos ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético e nocicepção induzida por formalina e por glutamato, bem como estímulo térmico no modelo de placa quente.

No ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, o tratamento com EEPG induziu a inibição, de forma significativa e dependente de concentração, da ação nociceptiva do ácido acético 0,6%. O valor da DI_{50} para o EEPG foi de $7,9 \pm 1,7$ mg/kg e o E_{max} de $98,8 \pm 1,2\%$ foi alcançado na dose de 100 mg/kg. A dipirona (40 mg/kg, v.o.), fármaco padrão utilizado, inibiu a resposta nociceptiva em 71,1% (**Gráfico 4**).

Gráfico 4 – Efeito do EEPG no ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético em camundongos.



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos tratados comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando $***p < 0,001$.

A administração intraperitoneal de agentes alogênicos, como ácido acético, provocam um comportamento estereotipado em camundongos caracterizado por contrações abdominais e dorso-abdominais, acompanhadas ou não pelo estiramento das patas traseiras (LE BARS, GOZARIU, CADDEN, 2001). Os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais iônicos (TRPV1 – receptor de potencial transiente vaniloide tipo 1, ASIC – canais iônicos sensíveis a ácidos, p. ex.) localizados nas fibras aferentes primárias promovendo o influxo de Ca^{2+} , despolarizando a fibra nervosa e ativando a abertura de canais de Na^+ dependente de voltagem, desencadeando, assim, potenciais de ação (JULIUS; BASBAUM, 2001; FEIN, 2009; ZIEGLGANSBERGER; BERTHELE; TOLLE, 2005).

A presença de ácido acético na cavidade peritoneal de camundongos promove a liberação de diversos mediadores inflamatórios como PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$, bradicinina, substância P, $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-8$ entre outros (RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Estas substâncias estimulam neurônios aferentes primários, aumentando a liberação de glutamato no fluido cérebro-espinal que irá atuar em receptores AMPA e NMDA aumentando o influxo de cátions no meio intracelular do neurônio desencadeando também em potenciais de ação (FENG; CUI; WILLIS, 2003).

As contorções abdominais podem ser inibidas não apenas por analgésicos, mas também por outras classes de fármacos, como antagonistas adrenérgicos, anti-histamínicos, relaxantes musculares e inibidores da monoamina oxidase – IMAO. Mesmo tendo uma baixa

especificidade, o ensaio de contorções abdominais é um método sensível de triagem para compostos com efeito antinociceptivo (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

Ouachrif et al. (2003) estudaram o efeito antinociceptivo do extrato metanólico obtido da casca de duas variedades de *P. granatum*, “Amrouz” e “Sefri”. No modelo de contorção abdominal, ambos os extratos inibiram 52% e 29% do número de contorções, respectivamente. No entanto, esses extratos inibiram com menor eficácia a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético quando comparado ao EEGP, uma vez que este inibiu aproximadamente 100% o número de contorções abdominais. Possivelmente, a presença de diferentes constituintes nesses extratos pode explicar a diferença no efeito observado nos dois estudos.

Considerando que o ensaio de contorção abdominal fundamenta-se na mensuração de respostas motoras dos animais, resultados falso-positivos poderiam ser obtidos caso ocorresse comprometimento motor por diminuição da excitabilidade neuronal. Para investigar se o tratamento com o EEGP estaria causando prejuízos motores ou sedação foi realizado o teste de campo aberto. Neste ensaio, conforme demonstrado na **Tabela 1**, evidenciou-se que o tratamento com EEGP (100 mg/kg, v.o.) alterou apenas o número de *crossing* e *rearing*. No entanto, alterações apenas nesses dois parâmetros não caracterizam um efeito de incoordenação motora. Estes resultados excluem a hipótese da redução das contorções abdominais produzido pelo EEGP ter sido resultante de ações sedativa ou interferência na capacidade motora dos camundongos.

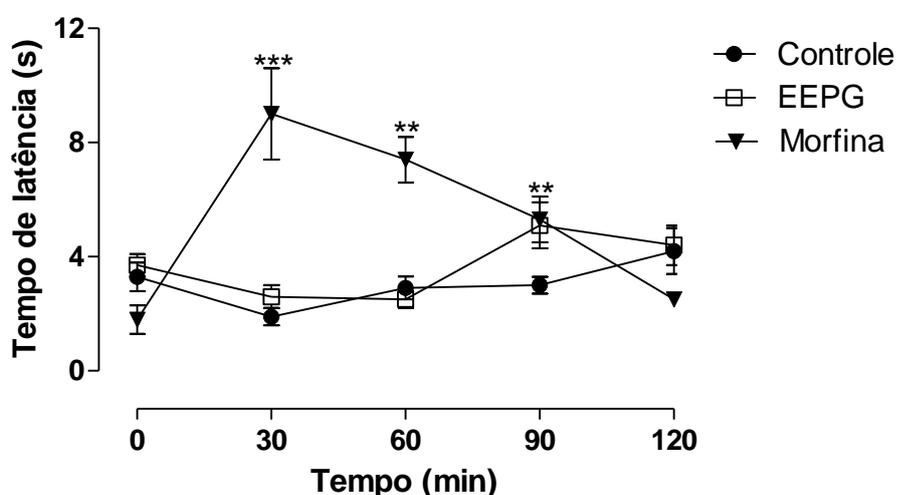
Tabela 1 – Efeito do EEGP na frequência de locomoção, nos índices de emocionalidade e no tempo de imobilidade em camundongos no teste do campo aberto

Tratamento	<i>Crossing</i>	<i>Rearing</i>	<i>Grooming</i>	Bolos fecais	Tempo imóvel
Veículo (10 mL/kg, v.o.)	62,7 ± 2,3	15,9 ± 0,9	4,7 ± 0,7	1,8 ± 0,5	32,9 ± 3,9
DZP (1,5 mg/kg, i.p.)	18,1 ± 2,2***	0,1 ± 0,1***	1,0 ± 0,5***	0,3 ± 0,2*	243,4 ± 6,6***
EEGP (100 mg/kg, v.o.)	54,1 ± 2,6*	10,2 ± 1,7**	6,8 ± 2,0	0,8 ± 0,6	45,1 ± 4,5

Nota: Os dados representam a média ± e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com respaldo no fato de que o ensaio de contorção abdominal é sensível a uma diversidade de substâncias com ação central e periférica, foi realizado o ensaio de placa quente para avaliar uma possível atividade antinociceptiva central do EEPG. Como observado no **Gráfico 5**, o tratamento com EEPG (100 mg/kg, v.o.) não alterou o tempo de latência dos animais em nenhum dos tempos analisados. Por outro lado, o tratamento com morfina (5 mg/kg, i.p.) aumentou de forma significativa o tempo de latência dos animais nos tempos de 30, 60 e 90 minutos.

Gráfico 5 – Efeito do EEPG no ensaio de placa quente



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

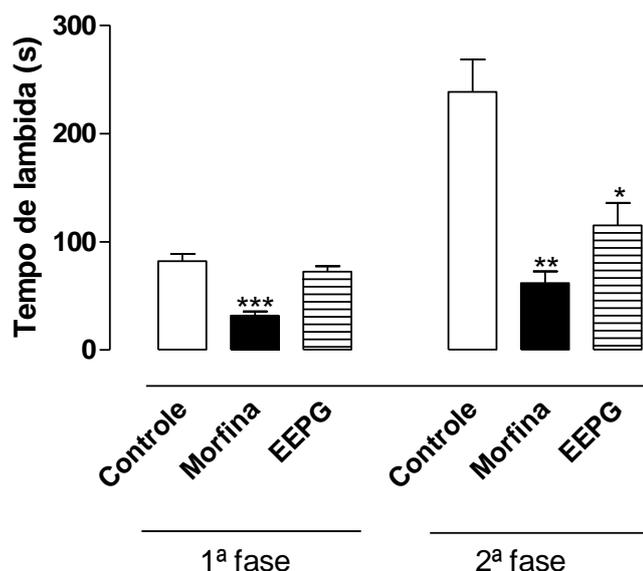
O estímulo térmico induz a dois tipos de comportamento no camundongo: retirada da pata e lambida da pata. Ambos são resultantes da ativação direta dos nociceptores pelo calor, que irão conduzir o estímulo doloroso ao corno dorsal da medula espinal e posteriormente aos centros corticais (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). O calor é capaz ativar receptores vaniloides, especificamente os receptores TRPV-1 (limiar de ativação em torno de 43 °C) e TRPV-2 (limiar de ativação em torno de 52 °C) (JULIUS; BASBAUM, 2001). Esses receptores são canais iônicos que, quando ativados, promovem o influxo de Ca^{2+} , despolarizando a fibra nervosa e ativando a abertura de canais de Na^+ dependente de voltagem, desencadeando, assim, potenciais de ação (ZIEGLGANSBERGER; BERTHELE; TOLLE, 2005).

Os resultados desse ensaio indicam que os compostos do EEPG possivelmente não modulam a resposta supraespinal, resultante da ativação de receptores periféricos.

Para melhor caracterização da atividade antinociceptiva e um possível efeito anti-inflamatório do EEGP, foi realizado o ensaio de formalina. Neste ensaio, o tratamento com EEGP (100 mg/kg, v.o.) não inibiu a fase neurogênica (1ª fase) da nocicepção induzida por formalina. No entanto, a fase inflamatória (2ª fase) foi inibida em 51,7% (**Gráfico 3**).

É descrito na literatura que analgésicos de ação central, como os fármacos opioides, são capazes de inibir ambas as fases do teste de formalina, enquanto AINEs e corticóides inibem apenas a fase inflamatória do teste (MIRANDA et al., 2001; EL HABAZI et al., 2006). Nossos dados corroboram com que está descrito na literatura, uma vez que o fármaco padrão utilizado, morfina (5 mg/kg, i.p.), inibiu ambas as fases em 64,2% e 74,1%, respectivamente (**Gráfico 6**).

Gráfico 6 – Efeito do EEGP no ensaio de nocicepção induzida por formalina em camundongos



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

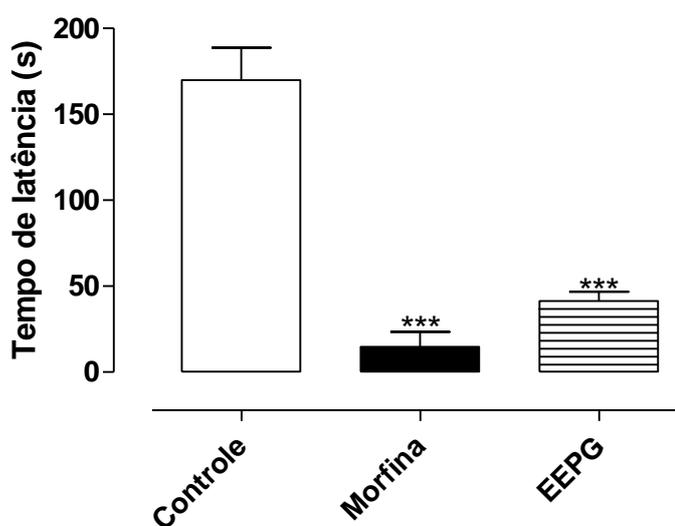
A formalina (2,5%) desencadeia intensa nocicepção, caracterizada por vigorosas lambidas e sacudidas na pata administrada com o agente irritante. A resposta à formalina desenvolve-se em duas fases. A fase neurogênica é iniciada logo após o estímulo e se prolonga por cinco minutos. Essa fase caracterizada pela estimulação predominante de fibras C subsequente à estimulação direta dos nociceptores periféricos (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Após os cinco minutos iniciais, há um período de ausência de resposta nociceptiva que dura cerca de dez minutos. Após esse período de repouso, inicia-se a fase inflamatória com

duração de aproximadamente quinze minutos e está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, prostaglandinas, bradicinina. Há também participação de citocinas como TNF- α e IL-1 β nessa fase tardia (GRANADOS-SOTO et al., 2001).

Diferente dos achados do ensaio anterior, o EEGP foi menos eficaz em reduzir a nocicepção induzida por formalina quando comparado ao estudo de Ouachrif et al. (2012), que demonstrou que as duas variedades de *P. granatum* estudadas são ativas em ambas as fases da formalina, com uma maior inibição da fase inflamatória.

Dando continuidade ao estudo, foi realizado o ensaio de nocicepção induzida por glutamato (30 μ mol/pata). Como demonstrado no **Gráfico 7**, o tratamento com EEGP (100 mg/kg, v.o.) inibiu 75,7% da nocicepção induzida por glutamato. Similarmente, a morfina (5 mg/kg, i.p.) inibiu 91,3% da resposta nociceptiva neste modelo.

Gráfico 7 – Efeito do EEGP no ensaio de nocicepção induzida por glutamato em camundongos



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando *** $p < 0,001$.

O glutamato é um aminoácido excitatório envolvido na transmissão nociceptiva, sendo seu efeito dependente da ativação tanto dos receptores NMDA como não-NMDA. Ademais, foi demonstrado que a via L-arginina-óxido nítrico está envolvida na resposta nociceptiva do glutamato neste modelo (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Além da participação no desenvolvimento da resposta nociceptiva, estudo também mostram o papel do glutamato na

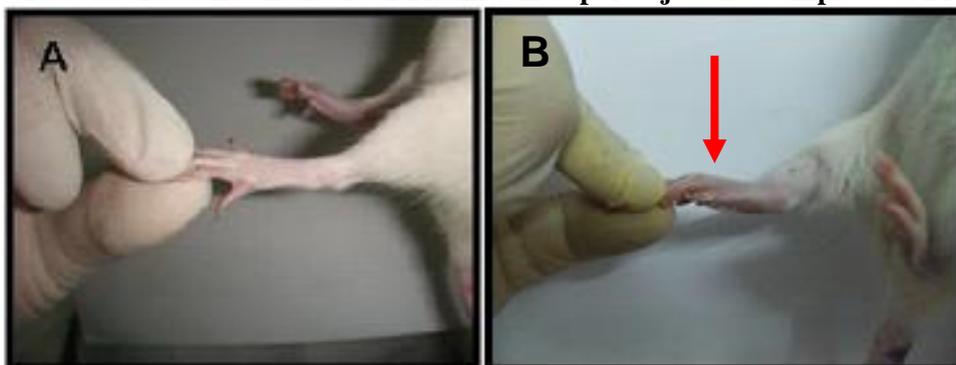
manutenção de tal processo (AANONSEN; WILCOX, 1990; FERREIRA; SANTOS, CALIXTO, 1999; MAO et al., 1992).

Os metabólitos no EEPG estão possivelmente modulando negativamente a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato, seja por antagonizar suas ações via receptor ou inibição da via L-arginina-óxido nítrico.

Estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos são metabólitos presente em diversas partes do *P. granatum*, incluindo a casca (NODA et al., 2002; JAIN et al., 2011). Uma vez presentes no EEPG, esses compostos podem ser responsáveis pela atividade antinociceptiva observada nesse estudo, uma vez que já foi relatado que os eles são capazes de reduzir a nocicepção em diversos modelos experimentais (FISCHER et al., 2008; GARATEIX et al., 2011).

A artrite foi estabelecida em todos os ratos pela administração do adjuvante completo de Freund após 14 dias da administração. Os animais controles não apresentaram nenhuma alteração no diâmetro da pata, uma vez que nestes foram administrados apenas salina (**Figura 11 A**). Nos animais que receberam o adjuvante observou-se inflamação na pata administrada (**Figura 11 B**).

Figura 11 - Pata dos ratos no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund.



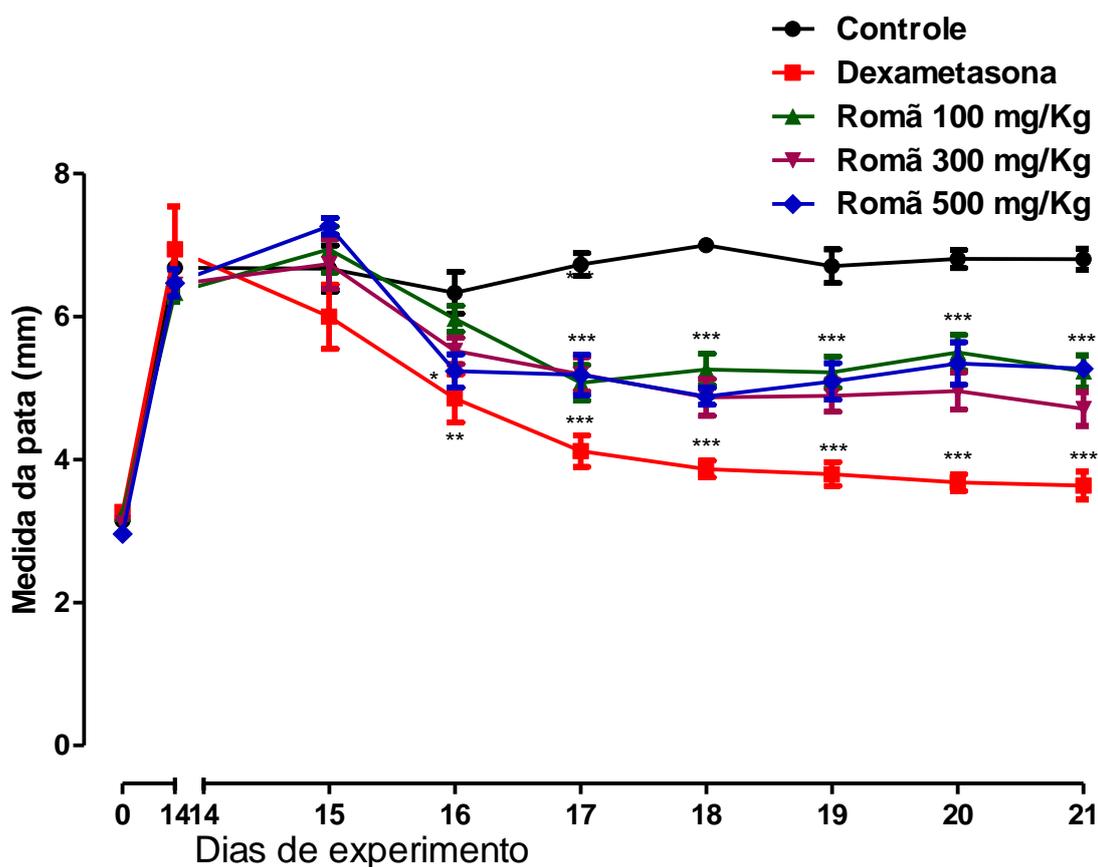
Fonte: Autora, 2014.

Nota: animal Controle normal (A) e animal artrítico administrado com adjuvante (B) após 14 dias de indução da artrite → eritema e edema na pata direita do animal artrítico causados pela administração do adjuvante completo de Freund.

Para determinar o efeito do tratamento com EEPG sobre o desenvolvimento da artrite, foram administradas três doses (100, 300 e 500 mg/kg, v.o.) durante sete dias a partir do dia 14 após a indução da artrite. O tratamento causou uma inibição estatisticamente significativa do aumento de volume da pata quando comparada ao controle positivo, tendo sido observado já uma inibição de forma significativa a partir do 16º na maior dose. Entretanto, a partir do

17º dias, todas as três doses reduziram de forma significativa ($***p < 0.001$) o volume da pata. O fármaco padrão utilizado, dexametasona, foi capaz de inibir o aumento de volume da pata significativamente nos dias 16, 17, 18 e 21 (**Gráfico 8**).

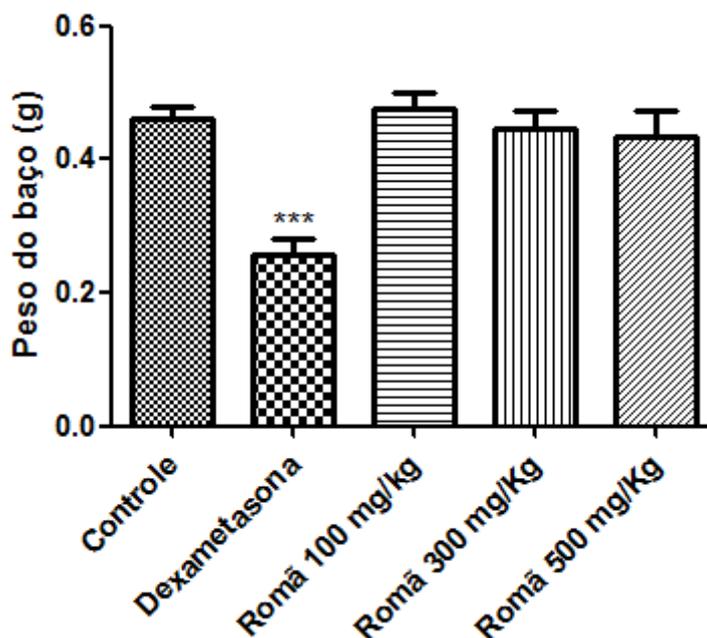
Gráfico 8 – Efeito do EEPG no ensaio de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos.



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ e $***p < 0,001$.

Depois da eutanásia dos animais, foram retirados baço e estômago para pesagem e análise macroscópica, respectivamente. O **Gráfico 9** demonstra que o tratamento com EEPG em nenhuma das três doses testadas foi capaz de reduzir a massa do baço, tal qual é vista quando este parâmetro foi significativo para o grupo tratado com dexametasona ($***p < 0.001$), já descrita a ação imunossupressora do glicocorticoides. Já a análise macroscópica dos estômagos, não se verificou nenhum ponto ulceroso nem traços hemorrágicos em nenhum dos grupos testados (dados não mostrados).

Gráfico 9 - Média de peso dos baços dos ratos submetidos ao tratamento com veículo, dexametasona ou EPPG no ensaio de artrite induzida por adjuvante de Freund



Nota: Os dados representam a média \pm e.p.m. dos grupos comparados ao controle através de uma Análise de variância (One-way ANOVA) seguidos do Teste de Dunnet, onde foram considerados significativos quando $***p < 0,001$.

O modelo de artrite induzida por adjuvante em ratos é amplamente utilizado para avaliação da atividade anti-inflamatória crônica de diversos compostos. É um experimento imunopatológico que apresenta características semelhantes a artrite reumatoide em humanos. Neste modelo, a artrite se desenvolve dentro de duas semanas e é caracterizada por edema de pata, bem como o desenvolvimento de lesões inflamatórias. A artrite reumatoide é uma desordem sistêmica autoimune caracterizada por hiperplasia sinovial e inflamação crônica. Embora as causas exatas da artrite reumatoide permaneçam desconhecidas, desregulação imunológica por citocinas inflamatórias podem estar envolvidos no seu desenvolvimento (WANG et al., 2005).

Na artrite reumatóide são produzidos altos níveis de IL-1 e TNF- α , que desempenham papéis essenciais na progressão da destruição conjuntiva e proliferação da membrana sinovial. Estudos demonstraram que a IL-1 e TNF- α reforçam a proliferação de fibroblastos, estimulam a produção de PGE2, aumento da expressão de citocinas e colágeno por células sinoviais. O TNF- α exerce a sua atividade através da indução de IL-1. Assim, a IL-1 e TNF- α são dominantes na indução de inflamação e erosão óssea. Prostaglandinas estão envolvidas em uma série de atividades biológicas relevantes para a patogênese da artrite. Estudos sugerem que alguns dos aspectos pró-inflamatórias da doença são mediados por PGE2. A neutralização

da PGE2 com anticorpos monoclonais reduziram tanto os sinais inflamatórios quanto os níveis de marcadores de doença (XU et al., 2010). Quimiocinas, como CCL2 e CCL5, também desempenham um papel importante na patogênese da reumatóide artrite (XU et al., 2007; KAPLAN et al., 2002). Os resultados mostraram que o EEPG nas três doses testadas foram eficientes ao induzir a inibição do edema característico da artrite induzida por adjuvante.

4 CONCLUSÃO

Com bases nos resultados deste estudo, podemos concluir que:

- O EEPG não possui ação citotóxica no ensaio de MTT;
- O EEPG não apresenta toxicidade em alta dose em curto prazo, visto que nenhum animal foi a óbito ou apresentou sinais de toxicidade;
- O EEPG apresenta metabólitos secundários como flavonoides, saponinas e taninos;
- EEPG modula negativamente a resposta nociceptiva, sem atuar por mecanismos centrais;
- O tratamento com EEPG (nas três doses testadas) foi capaz de reduzir o volume do edema da pata no ensaio de artrite induzida por adjuvante de Freund, sem efeito imunossupressor.

Os resultados obtidos neste trabalho dão suporte não somente a pesquisa com plantas medicinais, como também à pesquisa por novos fármacos analgésicos e anti-inflamatórios. Novos estudos são necessários para definição dos mecanismos de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da casca do fruto da *P. granatum*, porém, os resultados encontrados comprovam o uso popular da casca do fruto.

REFERÊNCIAS

- AANONSEN, L.M.; WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. **Pain**, v. 41, p. 309–321, 1990.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 202-209, 2007.
- ALMEIDA, R. N., FALCÃO, A. C. G.M, DINIZ, R. S. T., Quintans-Júnior, L. J, Polari RM, Barbosa-Filho JM, Agra MF, Duarte JC, Ferreira CD, Antonioli AR, Araújo CC. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 1999;80:72-6.
- ALBUQUERQUE, U. P. **Introdução à etnobotânica**. Editora: Bagaço. Recife, 2002.
- ARUN, N.; SINGH, D. P. Punica granatum: A Review on pharmacological and therapeutic properties. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. V. 3. P. 1240-1245, 2012.
- BARBOSA, Wagner L. R. QUIGNARD, Etienne. TAVARES, Esabel C. C. PINTO, Lucianna do N. OLIVEIRA, Franciêda Q. OLIVEIRA, Rodson M. de. Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais. **Revista Científica da UFPA**. Belém-PA. Vol.4 .2004.
- BARROS, I. M. C.; Lopes L. D.; Borges M. O.; Borges, A. C., Ribeiro, M, N.; Freire, S. M.; Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Pluchea quitoc ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 317-320, 2006.
- BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.
- BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**, v.31 n. 3, p. 277-281, 2003.
- BOTTING, R. M. Cyclooxygenase: Past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004). **Journal of Thermal Biology**, v. 31, p. 208-219, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Farmacêuticos. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de plantas medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília:** Ministério da Saúde, 2007.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 131-134, 2005.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 285-310, 1968.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa. Fundação Calante Guebenkian, 3ª edição, 2001.

CEOLIN, T; HECK, R. M; BARBIERI, R. L; MUNIZ, R. M; PILLON, N. Plantas Medicinais: transmissão do conhecimento nas famílias de agricultores de base ecológica no Sul do RS. **Revista da Escola de Enfermagem**, São Paulo, v. 45, n.1, p.47-54, 2011.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemistry Research**, v. 33, p. 1970-1978, 2008.

CIOLI, V., Putzolu, S., Rossi, V., Barcellona, P. S. & Corradino, C. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **50**, 283–289, 1979.

COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 285-310, 1968.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.

CRUSIO, W.E.; SCHWEGLER, H.; VAN-ABEELLEN, J.H. Behavior responses to novelty and structural variation of the hippocampus in mice – Quantitative-genetic analysis of behavior in the Open-Field. **Behavioural Brain Research**, v. 32, p. 74-80, 1989.

CUNHA, F. Q. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, O. (Org.). **Dor: princípios e prática**. Porto Alegre: Artmed., 2009. p. 147-212.

DA MATTA, C. B. B. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das macroalgas *Caulerpa mexicana* e *Caulerpa sertularioides* (Caulerpaceae)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, 2012.

DISTRUTTI, E. et al. Hydrogen sulphide induces μ opioid receptor- dependent analgesia in a rodent model of visceral pain. **Molecular Pain**, v., 6, n. 36, p. 1-16, 2010.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8-16, 2008.

EL HABAZI, K.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREF A, Z. A.; CHAIT, A.; DALAL, A. Study on the antinociceptive effects of *Thymus broussonetii* Boiss extracts in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 406-411, 2006.

FALKENBERG, M.B; SANTOS,R.I; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à Análise Fitoquímica**. Livro: Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Capítulo 10. 6ª Edição. UFRGS Editora. 1999. 229 p.

FEIN, A. **Nociceptors and the perception of pain**. Connecticut : University of Connecticut - Health Center, 2012.

Feng, Y., Cui, M. and Willis, W.D. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology** 98:729-733, 2003.

FERNANDES, J. H. M. **Semiologia ortopédica**. 2012. 1 ilustração, color. Disponível em < http://www.semiologiaortopedica.com.br/2012_10_01_archive.html>. Acesso em: 27 fev. 2013.

FERREIRA, A.B.H. Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa. 3.ed. Curitiba: Positivo, 2004. 2120p. IAL – Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4 ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 835-842, 1999.

FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL FILHO, V.; DE SOUZA, MM. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p. 235-239, 2008.

FRANÇA, I. S. X; SOUZA, J. A; BAPTISTA, R. S; BRITTO, V. R S. Medicina Popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**,v.61, n.2, p.201-208, 2008.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. Rio de Janeiro: G. Koogan, 2006.

GARATEIX, A.; SALCEDA, E.; MENÉNDEZ, R.; REGALADO, E.L.; LÓPEZ, O.; GARCÍA, T.; MORALES, R.A.; LAGUNA, A.; THOMAS, O.P.; SOTO, E. Antinociception produced by *Thalassia testudinum* extract BM-21 is mediated by the inhibition of acid sensing ionic channels by the phenolic compound thalassiolin B. **Molecular Pain**, v.24, p. 7-10, 2011.

GILROY, D.W. et al. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **Faseb Journal**, v. 18, p. 489-498, 2004.

GORMSEN, L. et al. Depression, anxiety, health-related quality of life and pain in patients with chronic fibromyalgia and neuropathic pain. **European Journal of Pain**, v. 14, p. 127, 2010.

GRANADOS-SOTO, V.; ALONSO-LOPEZ, R.; ASOMOZA-ESPINOSA, R.; RUFINO, M. O.; GOMES-LOPES, L. D.; FERREIRA, S. H. Participation of COX, IL-1 β and TNF- α in formalin-induced inflammatory pain. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 44, p. 15-17, 2001.

GRIS, P.; GAUTHIER, J.; CHENG, P.; GIBSON, D. G.; GRIS, D.; LAUR, O.; PIERSON, J.; WENTWORTH, S.; NACKLEY, A. G.; MAIXNER, W.; DIATCHENKO, L. A novel alternatively spliced isoform of the mu-opioid receptor: functional antagonism. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1-10, 2010.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 413-421, 2002.

HIKIJI, H.; ISHIB, S.; YOKOMIZO, T.; TAKATO, T.; SHIMIZU, T. A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.**, v.106, n.50, p.21294-21299, 2009.

HOEFFEL, J.L.M.; GONÇALVES, N.M.; FADINI, A.A.B.; SEIXAS, S.R.C. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas APA's Cantareira/SP e Fernão Dias/MG. **Revista Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**, v. 1, p. 1-25, 2011.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

IATSYNO AI, BELOVA LF, LIPKINA GS, SOKOLOV SYA, TRUTNEVA EA 1978. Pharmacology of Calendulose B – A new terpene glycoside obtained from the roots of *Calendula officinalis*. **Farmakologija i toksikologija** 41: 550-560.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing response of mice. **Life Science.**, Tokyo, v. 69, p.2911-2919, 2001.

JAIN, V.; MURUGANANTHANA, G.; DEEPAK, M.; VISWANATHA, G.L.; MANOHARA, D. Isolation and standardization of various phytochemical constituents from methanolic extracts of fruit rinds of *Punica granatum*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 9, p. 414–420, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KAPLAN AP, JOSEPH K, SILVERBERG M. Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 109: 195-209. 2002.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da

Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. 2002, 52: 4: 498 - 512.

KURASHI, Y.; HARADA, Y.; ARATANI, S.; SATOH, M.; TAKAGI, H. Involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LANGLEY, P. Why a pomegranate? **British of Medicine Journal**, v.321, n.4, p.1153-4, 2000.

LE BARS, D.; GOZARIU M.; CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacology Review**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LIMA, L. M. B.; SILVA, D. do N.; LYRA, M. A. M. Caracterização fitoquímica do vegetal *Punica granatum* Linn (romã) coletadas em duas cidades pernambucanas. 2º Congresso de Iniciação Científica da Faintvisa, 2012.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Nova Odessa, 2008.

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

LÓZ, D. W. da S.; BARROS, R. P.; NEVES, J. D. S.; Comercialização de plantas medicinais: um estudo etnobotânico nas feiras livres do município de Arapiraca –AL. **Revista Brasileira de Biologia e Farmácia**. V.7, n.2, p. 38-51.

MAO, J.; PRICE, D.D.; HAYES, R.L.; LU, J.; MAYER, D.J. Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. **Brain Research**, 598, 271–278, 1992.

MARCON, R. **Avaliação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos triterpenos semi-sintéticos: octanoato de alfa e beta-amirina** [dissertação de mestrado]. Santa Catarina, SC: Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MARSHALL, E. J. P.; BROWN, V. K.; BOATMAN, N. D.; LUTMAN, P. J. W.; SQUIRE, G. R.; WARD, L. K. The role of weeds in supporting biological diversity within crop fields. **Weed Research**. v. 43, p. 77–89, 2003.

MEDZHITOV, V. R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

- MEYER, R.A. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. In: McMAHON, S.B.; KOLTZENBURG, M. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. London: Elsevier, 2008. p. 3–34.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.
- MIRANDA, F.G.G.; VILAR, J. C.; ALVES, I. A.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, v. 1, p. 1-16, 2001.
- MONTENEGRO, M. R.; FECHIO, M. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. In: FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T. BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. (Org.). **Patologia: Processos gerais**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. cap. 7.
- MONTUSHI, P.; SALA, A.; DAHLÉN, S.; FOLCO, G. Pharmacological modulation of the leukotriene pathway in allergic disease. **Drug Discovery Today**, v. 12, p. 404-412, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods.**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.
- NODA, Y.; KANEYUKI, T.; MORI, A.; PACKER, L. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: dephinidin, cyanidin, and pelargonidin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 166-171, 2002.
- NOEL, M.; CHAMBERS, C. T.; McGRATH, P. J.; KLEIN, R. M.; STEWART, S.H. The influence of children's pain memories on subsequent pain experience. **Pain**, v. 153, p. 1563-1572, 2012.
- OLIVEIRA, L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; VALADARES, M C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20, n.2, p. 201-207, 2010.
- OUACHRIF, A.; KHALKI, H.; CHAIB, S.; MOUNTASSIR, M.; ABOUFATIMA, R.; VIDAL, A et al. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, p. 295-300, 2003.
- PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C. J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 55-68, 2009.
- PECCHI, E.; DALLAPORTA, M.; JEAN, A.; THIRION, S. TROADEC, J. Prostaglandins and sickness behavior: old story, new insights. **Physiology Behavior**, v. 97, p. 279-292, 2009.
- PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

RIBEIRO, R.A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**., v.387, n.1, p.111-118, 2000.

RODRIGUES, H. G; MEIRELES, C. G; LIMA, J. T. S; TOLEDO, G. P; CARDOSO, J. L; GOMES, S. L. Efeito Embriotóxico e abortivo da plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n. 3, p.359-366, 2011.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias, **Material Research**, v. 6, n. 3, p.317-320, 2003.

ROY, M.; PICHÉ, M.; CHEN, J.; PERETZ, I.; RAINVILLE, P. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 1-6, 2009.

SALTER, M. W. Cellular signaling pathways of pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 557-567, 2005.

SCADDING, J. Neuropathic pain. **Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation**, v. 3, n. 2, p. 8-14, 2003.

SERHAN, C. N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**. v. 6. P. 1191-1197, 2005.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SILVA, M. A. R. HIGINO, J. S.; PEREIRA, J. P.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; PEREIRA, M. S. Antibiotic activity of the extract of *Punica granatum* Linn. over bovine strains of *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n. 2, p. 209-212, 2008.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FELIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 642-654, 2008.

THURMOND, R. L.; GELFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. **Nature Reviews**, v. 7, p. 41-53, 2008.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia Popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto Contexto Enfermagem**. 15(1): 115-21. 2006.

TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 3549-3550, 2000.

TRACEY, I.; MANTYH, P.W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391, 2007.

TRACEY, I.; DICKENSON, A. SnapShot: Pain Perception. **Cell**, v. 148, p. 1308-1308e2, 2012.

TREEDE, R. D.; JANSEN, T. S.; CAMPBELL, J. N.; CRUCCU, G.; DOSTROVSKY, J. O.; GRIFFIN J. W.; HANSSON, P.; HUGHES, R.; NURMIKKO, T.; SERRA, J. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, v. 70, p. 1630-1635, 2008.

VALLANCE, P.; CHAN, E. N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart**, v. 85, p. 342-350, 2001.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterology and Motility**, v. 20, p. 73-80, 2008.

VIDAL, L. V. O.; Wilson Massamitu FURUYA, W. M.; GRACIANO, T. S. SCHAMBER, C. R.; SANTOS, L. D. e SOARES, C. M. Concentrações de Eugenol para anestesia profunda e toxicidade aguda em juvenis de piaveçu (*Leporinus macrocephalus*). **Acta Scientiarum Biological Sciences**. v. 29, n. 4, p. 357-362, 2007.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. **Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna**. Química Nova, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, W.; BERGH, A.; DAMBER, J.E. Cyclooxygenase-2 expression correlates with local chronic inflammation and tumor neovascularization in human prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, v.11, n.9, p. 3250-3256, 2005

WETERING, E. J. et al. Cognitive and behavioral interventions for the management of chronic neuropathic pain in adults – A systematic review. **European Journal of Pain**, v. 4, n. 7, p. 670-81, 2010.

WIENECKE, T.; OLESEN, J.; OTURAI, P. S.; ASHINA, M. Prostacyclin (epoprostenol) induces headache in healthy subjects. **Pain**, v. 139. p. 106-16, 2008.

WONG, M. M.; FISH, E. N. Chemokines: Attractive mediators of the immune response. **Seminars in Immunology**, v. 15, p. 5-14, 2003.

XU, Z,Z.; ZHANG, L.; LIU, T.; PARK, J.Y.; BERTA, T.; YANG, R.; SERHAN, C,N. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nature Medicine**., v.16, n.5, p. 592-7, 2010.

YAKSH, T.L.; RUDY, T.A. Studies on direct spinal action of narcotics in production of analgesia in rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 202, p. 411-428. 1977.

ZIEGLGANSBERGER, W.; BERTHELE, A.; TOLLE, T.R. Understanding neuropathic pain. **CNS Spectrums**, v. 10, n. 4, p. 289-308, 2005.

ZOCCALI, C. The endothelium as a target in renal diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 20, p. 39-44, 2007.