

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Raquel Cristina Schwanke

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO
FLAVONOIDE MIRICITRINA NA COLITE INDUZIDA PELO
SULFATO SÓDICO DE DEXTRANA (DSS) EM CAMUNDONGO
E ESTUDO DO SEU PERFIL FARMACOCINÉTICO EM
ROEDORES**

Florianópolis

2012

Raquel Cristina Schwanke

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO
FLAVONOIDE MIRICITRINA NA COLITE INDUZIDA PELO
SULFATO SÓDICO DE DEXTRANA (DSS) EM CAMUNDONGO
E ESTUDO DO SEU PERFIL FARMACOCINÉTICO EM
ROEDORES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Calixto

Colaboração: Dr^a. Veronika Butterweck

Florianópolis

2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schwanke, Raquel Cristina
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO FLAVONÓIDE
MIRICITRINA NA COLITE INDUZIDA PELO SULFATO SÓDICO DE
DEXTRANA (DSS) EM CAMUNDONGO E ESTUDO DO SEU PERFIL
FARMACOCINÉTICO EM ROEDORES. [tese] / Raquel Cristina
Schwanke ; orientador, João Batista Calixto -
Florianópolis, SC, 2012.
212 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. colite. 3. farmacocinética. 4.
flavonoide. I. Calixto, João Batista. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

Dedico esta tese a minha família, em especial aos meus pais, Rudi e Ingrid, a minha irmã Rúbia, e minha sobrinha Izabela.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por estar sempre presente e ter me dado força e determinação para vencer os momentos mais difíceis.

Ao meu orientador, professor Dr. João Batista Calixto, pela oportunidade da realização deste doutorado, e pela orientação prestada durante a execução do mesmo, a qual foi imprescindível para meu crescimento profissional e pessoal; sobretudo, lhe agradeço pelo apoio, paciência, credibilidade, e pelo exemplo de determinação, competência e dedicação.

A minha co-orientadora, Dra. Veronika Butterweck, pela incondicional ajuda na realização deste trabalho, pela paciência, orientação, incentivo, e, por ter me proporcionado um grande crescimento científico, principalmente na área de farmacocinética.

A minha família, meus pais Rudi e Ingrid, a minha irmã Rúbia e minha sobrinha Izabela, por todo apoio, incentivo, dedicação, paciência e sobretudo, pelo amor incondicional que me deram forças para vencer todos os obstáculos e a alcançar essa tão sonhada conquista. Vocês foram, e, sempre serão a minha base forte e a minha inspiração.

Ao meu namorado, Rafael, pelo apoio, incentivo, e principalmente, pela paciência durante todos esses anos, afinal, foram 6 anos consecutivos de muito estresse científico. Obrigada pela compreensão por todos os momentos de ausência. Gostaria de agradecer também, a família do Rafael, que hoje considero como minha, por toda a amizade e incentivo.

Ao professor Dr. Anicleto Poli, o qual estive sempre pronto para me ajudar. Obrigada professor por grandes ensinamentos, científicos e profissionais, durante esses quatro anos; obrigada por toda força e incentivo. O senhor é um exemplo de ser humano e, sua dedicação à vida acadêmica e aos alunos é muito inspiradora.

À Juliana Chaves e à Flávia Meotti por toda ajuda prestada para a realização deste trabalho e pelas discussões científicas que me ajudaram no meu crescimento científico.

Aos colaboradores deste trabalho e grande amigos, Allisson, Rodrigo e Rafael, por todo apoio na execução deste trabalho, pela troca de experiências científicas e, pela amizade e momentos de alegria.

Aos grandes amigos que aqui conquistei Mariane e Tatiana, obrigada pela amizade, compreensão, apoio e ajuda incondicional, levarei vocês sempre no meu coração.

Às grandes amigas que conquistei durante meu doutorado sanduíche nos EUA, Nívea e Aline. Obrigada por toda força e grande amizade, a ajuda de vocês foi fundamental para que eu pudesse atingir meus objetivos.

Aos colegas dos laboratórios nos EUA, em especial ao Dr. Chethan, Karin e Dr. Mohamed, obrigada por toda ajuda e aprendizado científico.

Aos amigos que conquistei nos EUA, alemães, obrigada a todos pela amizade e pelos momentos de descontração.

Aos professores do departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina por terem contribuído em minha formação e servirem como modelo de competência e dedicação.

Às amigas, Patrícia, Juliana e Aline, pela amizade, carinho, respeito, e por todo apoio durante todos esses anos.

Para todo pessoal do LAFEX, pelo apoio e troca de experiências científicas.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia, em especial ao Pedro, pela atenção e suporte.

Aos amigos da vida, pela amizade, apoio, compreensão, suporte emocional e, por todos os momentos de muita descontração.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

E, por fim, a todos os meus familiares que sempre torceram por mim e a todos àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Paciência é a confiança colocada em prática”

Hebreus 6.12-15

RESUMO

As doenças inflamatórias intestinais (IBD) são classificadas como um grupo de disfunções do trato gastrointestinal e representam importante problema de saúde pública mundial. Atualmente, as opções terapêuticas de primeira escolha para o tratamento das IBDs apresentam eficácia limitada, além de diversos efeitos adversos. Por essa razão, a busca por terapias mais promissoras para o tratamento dessas doenças é extremamente necessária. Os flavonoides são compostos fenólicos amplamente distribuídos na natureza e possuem inúmeras propriedades biológicas, dentre elas, atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, e dessa forma, são apontados na literatura, como alvo potencial para o tratamento das IBDs. O flavonoide miricitrina é encontrado em uma grande variedade de vegetais, especialmente nas folhas da espécie *Eugenia uniflora*. O presente estudo avaliou a ação anti-inflamatória da miricitrina no modelo de colite induzida pelo sulfato sódico de dextrana (DSS), bem como, alguns dos mecanismos envolvidos em seus efeitos em camundongos. Além disso, para que a atividade farmacológica da miricitrina, no modelo de colite experimental, fosse corretamente interpretada, desenvolvemos e validamos um método analítico, o qual foi aplicado com sucesso para a determinação do perfil farmacocinético da miricitrina em plasma de roedores. Nossos resultados demonstraram que o tratamento oral com miricitrina (1, 3, e 10 mg / kg) causou ação anti-inflamatória na colite aguda induzida pelo DSS, através da prevenção das lesões macro- e microscópicas do cólon, bem como, pela inibição da migração de neutrófilos para o local inflamado. Além disso, a miricitrina reduziu significativamente os níveis de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias, como, TNF- α , CXCL1/KC e IL-6 e a expressão das enzimas, NOS2 e COX-2, em tecido colônico dos animais com colite experimental. O tratamento oral com a miricitrina inibiu importantes vias inflamatórias após o tratamento DSS, incluindo a proteína quinase PKC ϵ , proteínas quinases ativadas por mitógeno, e o fator de transcrição nuclear kB. Por fim, os métodos analíticos validados neste trabalho mostraram-se seletivos, lineares, sensíveis, reprodutíveis e, apresentaram precisão e exatidão dentro dos limites preconizados pelas agências regulamentadoras e, por esta razão, puderam ser corretamente aplicados para a determinação do perfil farmacocinético deste composto em ratos e camundongos. Os resultados do perfil farmacocinético da miricitrina em plasma de roedores nos permitem

sugerir que, tanto a forma glicosilada da miricitrina, como os seus metabólitos formados, parecem ser os responsáveis pela sua ação anti-inflamatória e antinociceptiva após a administração oral do composto.

Palavras-chave: doenças inflamatórias intestinais; colite; miricitrina; farmacocinética.

ABSTRACT

Inflammatory bowel diseases (IBD) are classified as a group of gastrointestinal disorders representing an important public health problem. The current therapy used for the management of human inflammatory bowel disease has limited efficacy and many adverse effects. For this reason, the search for most promising therapies for the treatment of these diseases is extremely needed. Flavonoids are phenolic compounds widely distributed in nature and have a number of biological properties, including, antinociceptive and antiinflammatory activities. Therefore, the flavonoids are cited in the literature as a potential target for the treatment of IBDs. The flavonoid myricitrin is found in a wide variety of plants, especially in the leaves of the species *Eugenia uniflora*. In order to better understanding the biological activity of the compound, the determination of its pharmacokinetic profile is extremely important. Thus, this study aimed to investigate the antiinflammatory and antinociceptive actions of myricitrin in the model of acute colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). Furthermore, we have also developed and validated an analytical method which was successfully applied to determine the pharmacokinetic profile of myricitrin in the plasma of rodents. Our results showed that oral treatment with myricitrin (1, 3, and 10 mg/kg) exerted a marked anti-inflammatory action in DSS-induced acute colitis in mice, by preventing macro- and microscopic damage to the colon and the migration of neutrophils to the infected site. Furthermore, myricitrin significantly impaired the levels of pro-inflammatory cytokines/chemokines, namely TNF- α , CXCL1/KC and IL-6 and the expression of NOS2 and COX-2 enzymes in murine colon tissue. Moreover, the oral treatment with myricitrin also prevented important inflammatory pathways following DSS treatment, including the protein kinase PKC ϵ , mitogen-activated protein kinases, and the κ B nuclear transcription factor. The analytical methods validated in this work were selective, linear, sensitive, reproducible, and showed precision and accuracy within the limits preconized by regulatory agencies. Thus, it could be properly used to determine the pharmacokinetic profile of myricitrin in rats and mice. The pharmacokinetic profile in plasma of rodents allows us to suggest that both, the glycosylated form of myricitrin, as well as, their metabolites, seem to be the responsables for its pharmacological activity in the present study.

Key-words: Inflammatory bowel disease; colitis; myricitrin; pharmacokinetic.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo imunoregulatório desencadeado mediante processo inflamatório instalado no intestino.	39
Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides.	48
Figura 3. Estrutura química da miricitrina.	54
Figura 4. Razões para falha no desenvolvimento de novas drogas.	58
Figura 5. Efeito do flavonoide miricitrina sobre os parâmetros macroscópicos na colite experimental induzida pelo DSS em camundongos.	96
Figura 6. Efeito do flavonoide miricitrina sobre o dano macroscópico na colite experimental induzida pelo DSS em camundongos.	97
Figura 7. Efeito do flavonoide miricitrina sobre o tamanho do cólon dos animais com colite experimental induzida pelo DSS.	98
Figura 8. Efeito do flavonoide miricitrina sobre o dano microscópico do tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos.	100
Figura 9. Efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis de citocinas no tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos.	102
Figura 10. Efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão do RNAm para as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , na colite experimental induzida por DSS em camundongos.	103

Figura 11.	Efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis da proteína e do RNAm para as enzimas pró-inflamatórias, COX-2 e NOS2, na colite experimental induzida por DSS em camundongos.	104
Figura 12.	Efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis de PKCε no cólon dos animais com colite experimental induzida por DSS.	106
Figura 13.	Efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão das MAPKs no cólon dos animais com colite experimental induzida por DSS.	107
Figura 14.	Efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão do NF-κB no cólon dos animais com colite experimental induzida por DSS.	109
Figura 15.	Efeito do flavonoide miricitrina sobre a secreção de TNF-α em cultura primária de macrófago induzida por LPS.	110
Figura 16.	Efeito da administração oral de DSS 3% na sensibilidade dos camundongos frente a uma estimulação mecânica na região abdominal e ação antinociceptiva da miricitrina na hiperalgesia mecânica referida no abdômen.	112
Figura 17.	Avaliação da seletividade do método analítico empregado para quantificação da miricitrina em plasma de camundongo.	117
Figura 18.	Avaliação da seletividade do método analítico empregado para quantificação da miricitrina em plasma de rato.	118
Figura 19.	Determinação da linearidade dos métodos analíticos empregados para quantificação da miricitrina em plasma de camundongo e rato.	119

- Figura 20.** Perfil da concentração plasmática *versus* tempo e cromatograma representativo de uma amostra coletada após 15 minutos da administração i.v. da miricitrina em camundongos. **128**
- Figura 21.** Representação cromatográfica da amostra de plasma de camundongo coletada 30 minutos após a administração oral de miricitrina (30 mg/kg) em camundongos. **129**
- Figura 22.** Perfil da concentração plasmática *versus* tempo e cromatograma representativo de uma amostra coletada após 15 minutos da administração i.v. da miricitrina em ratos. **131**
- Figura 23.** Representação cromatográfica de amostra de plasma de rato coletado após 60 minutos da administração oral de miricitrina (40 mg/kg). **132**
- Figura 24.** Representação cromatográfica do metabólito, o ácido 3,5-dihidroxifenil acético, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS. **134**
- Figura 25.** Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 0,38 min, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS. **135**
- Figura 26.** Representação cromatográfica do metabólito, miricetina sulfatada, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS. **136**
- Figura 27.** Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 1,10 min, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS. **137**

Figura 28.	Representação cromatográfica do metabólito, o ácido 3-hidroxifenil acético, identificado em tecido colônico de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS.	139
Figura 29.	Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 0,44 min, identificado em tecido colônico de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS.	140
Figura 30.	Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 0,38 min, identificado em tecido colônico de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS.	141
Figura 31.	Correlação entre a atividade farmacológica do flavonoide miricitrina e seu perfil farmacocinético, após administração pelas vias oral e intravenosa em camundongo.	142
Figura 32.	Avaliação da atividade antinocicpetiva da miricitrina, administrada pela via oral, no modelo de dor induzida pela injeção de PMA (1 µg/mL) na pata dos camundongos.	143
Figura 33.	Representação esquemática do mecanismo pelo qual a miricitrina regula a fisiopatologia no modelo de colite induzida pelo DSS em camundongos.	174
Figura 34.	Correlação entre a atividade farmacológica e o perfil farmacocinético da miricitrina após sua administração pela via intravenosa.	175
Figura 35.	Correlação entre a atividade farmacológica e o perfil farmacocinético da miricitrina após sua administração pela via oral.	175

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Medicamentos e novos compostos em fase de desenvolvimento para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.	44
Tabela 2. Estudos <i>in vitro</i> da atividade de alguns flavonoides sobre a liberação de produtos relacionados ao desenvolvimento de processos inflamatórios como, as doenças inflamatórias intestinais.	52
Tabela 3. Estudos da atividade antiinflamatória de alguns flavonoides em modelo de colite experimental <i>in vivo</i> .	53
Tabela 4. Grade de escores para avaliação do dano macroscópico total na colite induzida por DSS.	69
Tabela 5. Escore histológico para quantificação do grau de inflamação intestinal.	70
Tabela 6. Padronização do método analítico para quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de camundongo e em plasma de rato.	115
Tabela 7. Análise estatística para a determinação do LD e LQ da miricitrina em plasma de camundongo.	121
Tabela 8. Eficiência de extração da miricitrina do plasma de camundongo.	122
Tabela 9. Eficiência de extração da miricitrina e quercetina (PI) do plasma de rato.	122
Tabela 10. Análise do efeito de matriz (plasma de rato) sobre a miricitrina e a quercetina, utilizando sistema LC-MS/MS.	123

Tabela 11.	Determinação da precisão e da exatidão da miricitrina em plasma de camundongo através do ensaio intra-dia (n=5) e inter-dia (n=15).	124
Tabela 12.	Determinação da precisão e da exatidão da miricitrina em plasma de rato através do ensaio intra-dia (n=6) e inter-dia (n=18).	125
Tabela 13.	Estabilidade do composto miricitrina após procedimento de extração em plasma de rato.	126
Tabela 14.	Parâmetros farmacocinéticos após administração única de miricitrina na dose de 3 mg/kg em camundongos.	127
Tabela 15.	Parâmetros farmacocinéticos após administração única de miricitrina na dose de 2 mg/kg em ratos.	130

LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência nacional de vigilância sanitária
ASA	Ácido 5-aminosalicílico
ASC _{0-INF}	Área sob a curva do zero ao infinito
CARD 15	Domínio de recrutamento de caspase 15
CD	Doença de Crohn
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CL	Clearance
COX	Ciclooxigenase
Cp0	Concentração plasmática máxima no tempo zero
CV	Coefficiente de variação
DAB	3,3', 4,4' – tetraaminobenfeniltetrahydroclorídrico
Dil-QC	Amostra controle de qualidade diluída
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dubelco
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementar
dNTPs	Deoxinucleotídeos
DP	Desvio padrão
DSS	Sulfato sódico de dextrana
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FDA	Food and Drug Administration
H&E	Hematoxilina e eosina
HPLC-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência
HQC	Amostra controle de qualidade de maior concentração
p.o.	Via oral
i.v.	Via intravenosa
IAD	Índice de atividade da doença
IBD	Doença inflamatória intestinal
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IκB	Proteína inibitória do NFκB
IκK	Complexo IκB quinase
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
Ke	Constante de eliminação
LAFEX	Laboratório de Farmacologia Experimental
LC	Cromatografia líquida
LD	Limite de detecção
LLOQ	Menor limite de quantificação
LPS	Lipopolissacarídeo
LQ	Limite de quantificação

LQC	Amostra controle de qualidade de menor concentração
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MPO	Mieloperoxidase
MQC	Amostra controle de qualide de concentração
intermediária	
MS	Espectrômetro de massas
MUC-2	Mucina 2
<i>m/z</i>	Razão massa carga
NF-κB	Fator nuclear κB
NOD	Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGE	Prostaglandina E
PI	Padrão interno
QC	amostra controle de qualidade
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
S _a	Desvio padrão do coeficiente angular
S _b	Desvio padrão do coeficiente linear
<i>t</i> _{1/2}	Tempo de meia-vida
Th	Célula T “helper” ou auxiliar
<i>t</i> _{máx}	Tempo para atingir a concentração máxima
TMB	Tretametilbenzidina
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
V _d	Volume de distribuição

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	29
1.1 Doenças inflamatórias intestinais	29
1.2 Epidemiologia	30
1.3 Causas doenças inflamatórias intestinais	31
1.3.1 Fatores genéticos	31
1.3.2 Fatores ambientais	33
1.3.3 Importância da integridade da barreira da mucosa intestinal	34
1.4 Imunobiologia nas IBDs	36
1.5 Alterações histopatológicas e manifestações clínicas das IBDs	40
1.5.1 Dor abdominal: sintoma das doenças inflamatórias intestinais	40
1.6 Tratamento das IBDs	41
1.7 Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais	45
1.8 Novas terapias alternativas para o tratamento das IBDs	47
1.8.1 Flavonoide: conceito e estrutura química	47
1.8.2 Flavonoides: propriedades biológicas	49
1.8.3 Atividade antiinflamatória dos flavonoides nas IBDs	50

1.8.4 Miricitrina	54
1.9 Farmacocinética: conceitos	55
1.10 Importância do estudo farmacocinético de novas drogas durante a fase pré-clínica do desenvolvimento farmacêutico	57
1.11 Determinação do perfil farmacocinético de um composto	58
1.11.1 Uso de HPLC-MS para quantificação de compostos em matriz biológica	58
1.11.2 Padronização e validação de métodos cromatográficos empregados para análise de um composto em matriz biológica	60
2 HIPÓTESE	63
3 OBJETIVOS	65
3.1 Objetivos Gerais	65
3.2 Objetivos Específicos	65
4 MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1 Animais	67
4.2 Indução da colite experimental aguda pelo DSS	67
4.3 Tratamento	68
4.4 Índice da atividade da doença (IAD)	68
4.5 Dano macroscópico	68
4.6 Escore microscópico	70
4.7 Dosagem de citocinas	70
4.8 Análise Imunohistoquímica	71

4.9 Extração do RNA total	72
4.10 Confeção do DNA complementar (reação de transcrição reversa)	73
4.11 Reação em cadeia da polimerase em tempo real	74
4.12 Obtenção e cultura primária de macrófagos derivados da medula óssea	74
4.13 Estimulação, incubação e coleta dos macrófagos derivados da medula óssea	75
4.14 Avaliação da Hiperalgisia secundária	75
4.15 Padronização do método analítico para quantificação da miricitrina em plasma de roedores	76
4.15.1 Preparação das soluções estoque e de trabalho	76
4.15.2 Condições instrumentais e cromatográficas	77
4.15.3 Preparação das amostras em plasma	79
4.16 Validação do método analítico	80
4.16.1 Seletividade	80
4.16.2 Linearidade	80
4.16.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	81
4.16.4 Ensaio de Recuperação	82
4.16.5 Efeito de matriz em plasma de rato	83
4.16.6 Precisão	84
4.16.7 Exatidão	86

4.16.8 Ensaio de estabilidade em plasma de rato	86
4.17 Estudo do perfil farmacocinético da miricitrina em roedores	87
4.17.1 Análise da miricitrina em plasma de camundongo	87
4.17.2 Análise da miricitrina em plasma de rato	88
4.18 Estudo preliminar do processo de metabolização da miricitrina em camundongos	89
4.18.1 Coleta do material em camundongos	89
4.18.2 Identificação da miricitrina e seus possíveis metabólitos em plasma e no cólon de camundongo pela técnica de LC-MS/MS (Q-Tof)	89
4.19 Estudo da correlação <i>in vivo</i> entre a atividade antinociceptiva da miricitrina e sua concentração plasmática	90
4.19.1 Avaliação da atividade antinociceptivo	90
4.19.2 Estudo farmacocinético da miricitrina em camundongos	91
4.20 Determinação do coeficiente de partição da miricitrina em octanol/água	91
4.21 Drogas e Reagentes	92
4.22 Análise estatística	93
5 RESULTADOS	95
5.1 Avaliação da ação do flavonoide miricitrina sobre a gravidade da colite experimental induzida por DSS em camundongos	95
5.2 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre o dano microscópico do tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos	98

5.3 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis de citocinas no tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos	101
5.4 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias na colite experimental induzida por DSS em camundongos	102
5.5 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão de enzimas inflamatórias na colite experimental induzida por DSS em camundongos.	103
5.6 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão da PKC ϵ na colite experimental induzida por DSS em camundongos	105
5.7 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a ativação das MAPks na colite experimental induzida por DSS em camundongos	106
5.8 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a ativação do NF- κ B na colite experimental induzida por DSS em camundongos	108
5.9 Efeito do flavonoide miricitrina e sua forma aglicona, miricetina, sobre a secreção de citocinas em cultura primária de macrófagos estimuladas com LPS	109
5.10 Atividade antinociceptiva da miricitrina na hiperalgesia mecânica referida no abdômen	111
5.11 Padronização do método analítico para quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de camundongo e rato	112
5.11.1 Em plasma de camundongo	112
5.11.2 Em plasma de rato	114
5.12 Validação do método analítico para quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de camundongo e rato	115
5.12.1 Seletividade	116
5.12.2 Linearidade	118

5.12.3 Sensibilidade	120
5.12.4 Recuperação	121
5.12.5 Estudo do efeito de matriz para análise da miricitrina e da quercetina em plasma de rato	123
5.12.6 Precisão e exatidão	123
5.12.7 Estudo da estabilidade da miricitrina após extração do plasma de rato	125
5.13 Estudo de farmacocinética do flavonoide miricitrina em camundongo	126
5.14 Estudo de farmacocinética do flavonoide miricitrina em rato	129
5.15 Identificação do flavonoide miricitrina e/ou seus metabólitos no plasma e no cólon de camundongo após sua administração durante sete dias consecutivos	132
5.15.1 Análise das amostras de plasma	132
5.15.2 Análise das amostras de cólon	137
5.16 Correlação entre a atividade farmacológica da miricitrina e seu perfil farmacocinético após administração pelas vias oral e intravenosa	141
5.17 Determinação do coeficiente de partição da miricitrina em octanol/água	144
6 DISCUSSÃO	145
7 CONCLUSÃO	171
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
ANEXOS	215

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças inflamatórias intestinais

As doenças inflamatórias intestinais (IBD, do inglês *inflammatory bowel disease*) são amplamente estudadas, pois representam um importante problema de saúde pública mundial (Baumgart e Sandborn, 2007a). As IBDs podem ser classificadas genericamente por um grupo de disfunções inflamatórias do trato digestivo, caracterizadas por dano tecidual e inflamação da mucosa intestinal. As duas principais IBDs são a doença de Crohn (CD, do inglês Crohn's disease) e a colite ulcerativa (UC, do inglês ulcerative colitis) (Aharoni *et al.*, 2006).

A CD, também conhecida como ileíte terminal, é uma doença crônica, de causa desconhecida, que evolui por surtos de natureza inflamatória (Bonen e Cho, 2003). A CD tem característica transmural, afetando principalmente a mucosa e submucosa, não sendo restrita, portanto, às áreas ulceradas. Esta doença intestinal pode acometer, de forma descontínua, todo o trato digestivo, afetando desde a boca até o ânus. Os sintomas clínicos mais comuns incluem dor abdominal, diarreia com ou sem sangue, náuseas, vômito, febre e anorexia. Além disso, a presença de fístulas no trato gastrointestinal (TGI) é muito comum (Baumgart e Sandborn, 2007a).

Por outro lado, a UC é uma doença inflamatória não transmural, a qual se limita a mucosa intestinal, mais especificamente, na região do cólon e, o comprometimento é contínuo, iniciando principalmente pela parte distal do reto. A UC evolui por surtos, ocorrendo períodos de exacerbação e remissão das lesões e dos sintomas, às vezes ao longo de muitos anos. Os sintomas clínicos incluem principalmente diarreia sanguinolenta, dor abdominal e eliminação de pus durante as evacuações (Baumgart e Sandborn, 2007a). Além disso, a presença de fístulas no cólon é menos frequente que na CD. Porém, a incidência de abscessos nas criptas intestinais é significativamente maior em pacientes com UC, em relação àqueles portadores da CD (Baumgart e Sandborn, 2007a). Uma das maiores complicações observadas em pacientes com algum tipo de IBD, além dos eventos inflamatórios já descritos, é a provável evolução para o câncer de cólon (Pohl *et al.*, 2000), o qual é responsável pelo aumento da mortalidade desses pacientes quando comparado aos indivíduos que apresentam câncer de cólon de forma esporádica (Richards *et al.*, 1989).

1.2 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos demonstram que a incidência das IBDs vem aumentando de forma significativa desde 1950, e que, até a última década, a maior incidência dessas doenças ocorria principalmente, em países desenvolvidos no mundo ocidental. Por outro lado, em países em desenvolvimento da Europa Oriental, América do Sul, África e Ásia, a taxa de incidência dessas doenças era muito inferior (Lakatos e Lakatos, 2006). Acredita-se que a maior incidência das IBDs em países com maior índice de desenvolvimento humano (IDH) ocorra pelo fato destes países apresentarem níveis de industrialização elevados, capazes de gerar graves alterações no meio ambiente, os quais são responsáveis pelas alterações em genes que estão diretamente relacionados ao desenvolvimento das IBDs. De fato, há estudos demonstrando que indivíduos que migraram de locais menos desenvolvidos para locais mais desenvolvidos apresentavam maior chance de desenvolver alguma disfunção genética associada às IBDs, enquanto que, indivíduos que fizeram a migração de locais mais desenvolvidos para os menos desenvolvidos não apresentavam essa tendência (Zheng *et al.*, 2005). Outro fator apresentado para explicar a diferença no quadro epidemiológico mundial, é a diferença dos métodos de sanitização e higiene entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. Os países em desenvolvimento apresentam condições sanitárias e de higiene mais precárias e de difícil acesso à população. Por esse motivo, acredita-se que as crianças recém nascidas e/ou bebês até 2 anos de idade (fase na qual se desenvolve o arsenal imunológico de um indivíduo) desenvolveriam um sistema imune mais eficiente e por isso, apresentariam quando adultos, uma menor tendência ao desenvolvimento das IBDs (Gent *et al.*, 1994; Hampe *et al.*, 2003).

Estudos recentes mostram que o quadro epidemiológico das IBDs no mundo está mudando. Áreas que antes eram consideradas de baixa prevalência, como no sul da Europa, Ásia e países em desenvolvimento, têm apresentado um aumento na incidência dessas doenças. Por outro lado, em regiões que antes eram consideradas de alta prevalência, como na América do Norte e Norte da Europa, a incidência dessa doença vem se estabilizando (Lakatos, 2006). Até 2005, a taxa mundial de incidência de UC variou entre 0,5-24,5/cem mil habitantes, enquanto que, para a CD os números oscilaram entre 0,1-16/cem mil habitantes, apresentando taxa de prevalência de aproximadamente 400 casos em cem mil habitantes (Ouyang *et al.*, 2005).

1.3 Causas das doenças inflamatórias intestinais

A patogênese das IBDs é multifatorial e, desta forma, a ocorrência dessas doenças pode ser influenciada por diversos fatores, tais como, idade, raça, etnia, região geográfica, e principalmente, fatores genéticos (histórico familiar) associados aos fatores ambientais, os quais estão relacionados aos hábitos de vida dos indivíduos, como, por exemplo, o tabagismo e a dieta alimentar (consumo excessivo de açúcar, gordura animal e proteínas), que podem acelerar o desenvolvimento de inflamações intestinais (Sartor, 2006; Bernstein e Shanahan, 2008; Kaser *et al.*, 2010a).

1.3.1 Fatores genéticos

O componente hereditário tem se mostrado bastante relacionado ao desenvolvimento das IBDs. Parentes de primeiro grau de indivíduos afetados pelas IBDs parecem ter um risco cinco vezes maior no desenvolvimento desta patologia (Xavier e Podolsky, 2007). Estudos realizados com gêmeos monozigotos (que possuem 100% de concordância gênica) e gêmeos dizigotos (50% de concordância gênica) mostraram que, mesmo crescendo em um ambiente similar, a taxa de desenvolvimento de CD e UC foi significativamente maior em gêmeos monozigotos, os quais apresentaram um risco 800 vezes maior de desenvolver a CD (Halme *et al.*, 2006). Outra evidência da influência do fator genético no desenvolvimento das IBDs é a existência de uma correlação entre pacientes acometidos pelas IBDs e seus parentes de primeiro grau. Estudos mostraram que pacientes acometidos pela CD ou UC, apresentavam cerca de 2-16% e de 5-15%, respectivamente, de parentes de primeiro grau acometidos pela mesma doença (Baumgart e Carding, 2007b).

No ano de 2005, foi realizado um estudo de associação genômica (GWAS, do inglês, *genome-wide association studies*) com a finalidade de identificar as principais alterações cromossômicas responsáveis pelo desenvolvimento das IBDs. Os resultados obtidos pelo estudo em questão mostraram que existem loci (local fixo em um cromossomo onde está localizado determinado gene) os quais estão envolvidos de forma específica com a CD, como: alterações em loci de receptores do tipo NOD (NOD2, do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain 2*), intelectinas (ITLN1, intelectina-1), e genes relacionados à autofagia, como o ATG16L1 (do inglês, *Autophagy-related protein 16-1*). Por outro lado, foram identificados loci que estão

relacionados, de forma específica, com a UC, como: alterações em loci relacionados à via regulatória (IL-10 e ARPC2), à função das células epiteliais intestinais (ECM1), e à proteína ubiquitina ligase E3 (HERC2). Porém, o estudo também identificou outros locus os quais parecem estar envolvidos com ambas às patologias (Budarf *et al.*, 2009).

Nesse contexto, estudos mostraram que alterações no gene CARD15 (do inglês, *caspase recruitment domain 15*), que codifica para proteínas intracelulares como a proteína NOD2, que são responsáveis pelo reconhecimento de fragmentos bacterianos, estão associados ao desenvolvimento das IBDs. A proteína NOD2 está preferencialmente expressa em macrófagos e células dendríticas e sua ativação, em resposta à estimulação bacteriana, aciona vias de sinalização intracelulares, as quais ativam a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK, do inglês, *mitogen activated protein kinases*) bem como, fatores de transcrição, como o fator nuclear κ B (NF- κ B) (Bonen e Cho, 2003; Inohara *et al.*, 2003; Magalhaes *et al.*, 2007). Interessantemente, estudos evidenciaram que, de fato, mutações no gene CARD15 ocorrem em cerca 10-15% dos pacientes com CD (Hugot *et al.*, 2001; Ogura *et al.*, 2001).

Já está bem estabelecido na literatura que o equilíbrio entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é fundamental para a manutenção da homeostase no intestino, e que a desregulação desse sistema leva à iniciação e à perpetuação de uma resposta inflamatória intestinal. De fato, estudos mostraram que, mutações nos genes que codificam citocinas e seus receptores, responsáveis pelo controle da proliferação e ativação de células T, estão amplamente associadas ao desenvolvimento das IBDs (Baumgart e Carding, 2007b). Mutações recessivas nos genes que codificam tanto o receptor de interleucina 10 (IL-10), quanto a própria citocina IL-10, estão associadas com o desenvolvimento da CD em recém-nascidos (Glocker *et al.*, 2009). Além disso, já é sabido que camundongos deficientes em IL-10 desenvolvem colite de forma espontânea (Kuhn *et al.*, 1993). Uma possível explicação pelo qual a deleção da IL-10 desencadeia o desenvolvimento de IBDs reside no fato desta citocina ser fundamental para a manutenção da homeostase intestinal, uma vez que a IL-10 é uma citocina do tipo anti-inflamatória, capaz de reduzir a ativação de linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2) (Kuhn *et al.*, 1993). Outra citocina que parece estar envolvida no desenvolvimento das IBDs é a IL-22, responsável pela estimulação da produção de muco pelas células epiteliais intestinais, como as células caliciformes. Recentemente, foi demonstrado que a mucina-2 (MUC2),

uma glicoproteína secretada pelas células caliciformes, cuja função é reparar e proteger a mucosa intestinal, apresentava-se mutada em pacientes com IBD. Além disso, foi observado que camundongos com deleção gênica para a MUC2 (MUC^{-/-}) são capazes de desenvolver colite espontânea (Strober *et al.*, 2007).

Outro tipo de mutação genética que parece estar diretamente relacionada ao desenvolvimento das IBDs são as alterações nos genes que codificam proteínas que regulam o processo de autofagia, como o gene *ATG16L1*, amplamente expresso em células intestinais, como células de Paneth. Estudos comprovaram que uma simples mutação neste gene gera uma perda da capacidade de capturar bactérias, aumentando desta forma o dano intestinal e o risco de desenvolvimento da doença de Crohn (Cadwell *et al.*, 2008; Kuballa *et al.*, 2008).

Embora as alterações genéticas representem um importante fator para o desenvolvimento das IBDs, conforme descrito anteriormente, é necessário ressaltar que nem todos pacientes que apresentam algum tipo de mutação genética desenvolvem inflamação intestinal, o que de fato, ressalta que a interação entre os fatores genéticos e os fatores ambientais é fundamental para o desenvolvimento das IBDs (Kaser *et al.*, 2010b).

1.3.2 Fatores ambientais

Inúmeros são os fatores ambientais que parecem estar associados com o desenvolvimento das IBDs, tais como: tabagismo, higiene e estresse (Sartor, 2006; Bernstein e Shanahan, 2008). Além disso, alterações na microbiota intestinal induzida pela dieta, antibióticos, contraceptivos orais, estresse emocional e infecção entérica, também representam um gatilho para o desenvolvimento das IBDs (Tamboli *et al.*, 2004; Sartor, 2006). Nesse contexto, estudos têm demonstrado que pacientes que apresentam alguma forma de IBD, apresentam um desequilíbrio entre os microorganismos da flora intestinal. Foi observado, ainda, nesses pacientes, uma redução de bactérias da ordem das *Clostridiales*, *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, constituintes da flora intestinal “normal” de humanos, e um aumento no número de bactérias do tipo *Enterobacteriaceae* (família de bactérias Gram negativas que apresentam características patológicas), dentre elas, a *Escherichia coli* (Sartor, 2008; Willing *et al.*, 2010; Frank *et al.*, 2011). Além disso, estudos recentes levantam a hipótese de que o intestino inflamado é capaz de selecionar o crescimento de certos microorganismos patogênicos, como por exemplo, *Salmonella*

typhimurium, um soro-tipo da *Salmonella* causadora de gastroenterites (Sartor, 2008).

Outro fator intimamente relacionado ao desenvolvimento das IBDs é o tabagismo. A associação do tabagismo ao desenvolvimento das IBDs é ainda uma questão ambígua para muitos pesquisadores, pois, do ponto de vista clínico, o tabagismo parece agravar os sintomas da CD, além de aumentar consideravelmente os riscos de recorrência clínica quando comparados com pacientes não fumantes (Cottone *et al.*, 1994; Lee e Lennard-Jones, 1996). Por outro lado, na UC, o tabagismo parece amenizar os sintomas da doença, uma vez que, o número de hospitalizações de pacientes acometidos com a UC é inferior em fumantes em relação a pacientes não fumantes (Boyko *et al.*, 1988). Além disso, o uso de adesivos de nicotina associado a terapias convencionais tem sido utilizado em pacientes com UC moderada, uma vez que esta associação promove a redução dos sintomas clínicos nestes pacientes (Pullan *et al.*, 1994). Os efeitos benéficos/maléficos do fumo nas IBDs parecem estar relacionados ao efeito da nicotina na modulação da resposta imune, através da inibição da resposta mediada por linfócitos Th2 que predominam na UC, e não sob os linfócitos Th1, característicos da CD, o que explicaria o fato de a nicotina apresentar-se como um fator protetor em pacientes com UC (Madretsma *et al.*, 1996). Ademais, estudos experimentais sugerem que o efeito benéfico da nicotina na UC esteja relacionado ao aumento na produção de muco, diminuição na produção óxido nítrico e melhorias na função da barreira epitelial. Na CD, a nicotina parece agravar ainda mais os sintomas, devido ao aumento da migração de neutrófilos para a lâmina própria (Cosnes, 2004). Entretanto, até o momento, os componentes do cigarro responsáveis por estas observações não foram ainda identificados e, por esta razão, estudos mais específicos devem ser realizados para uma melhor compreensão dos efeitos do tabagismo sobre as IBDs.

1.3.3 Importância da integridade da barreira da mucosa intestinal

A conservação da integridade da barreira epitelial intestinal representa a primeira linha de defesa do organismo frente a microorganismos patogênicos e, desta forma, constitui outro fator determinante para a manutenção da homeostase intestinal. A barreira epitelial intestinal é formada por células epiteliais especializadas, como os enterócitos, as células caliciformes (ou, do inglês, goblet cells) e as

células de Paneth, as quais são cobertas por uma fina camada de muco (Gersemann *et al.*, 2011; Maloy e Powrie, 2011).

As células caliciformes são responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos (AMPs, do inglês, *antimicrobial peptides*) e de muco, sendo cruciais para a proteção do epitélio intestinal (Maloy e Powrie, 2011). Conforme descrito anteriormente, pacientes com inflamação intestinal apresentam alterações na glicoproteína MUC2, uma proteína amplamente secretada pelas células caliciformes que, juntamente com lipídios, eletrólito e água compõem o muco intestinal (Strober *et al.*, 2007).

As células de Paneth estão presentes nas criptas intestinais e são responsáveis pela produção de peptídeos antimicrobianos como: lisozimas, defensinas e lectinas, que têm como principal função a limitação da colonização por bactérias comensais e proteção do tecido contra micro-organismos patogênicos (Gersemann *et al.*, 2011; Maloy e Powrie, 2011). Neste contexto, estudos mostraram que a mutação no fator de transcrição responsável pela maturação das células de Paneth está associada ao surgimento de CD (Gersemann *et al.*, 2011).

O terceiro tipo de célula epitelial constituinte da barreira epitelial intestinal são os enterócitos. Essas células possuem pequenas vilosidades e atuam como um canal de condução para antígenos, constituindo a interface entre o lúmen intestinal e o tecido linfóide adjacente. Desta forma, através dos enterócitos, os antígenos presentes no lúmen intestinal são apresentados aos linfócitos, presentes nas placas de Peyer e folículos linfóides, através das células apresentadoras de antígenos APCs (Mach *et al.*, 2005).

Outro fator determinante para a integridade da barreira epitelial intestinal é a forte aderência entre as células epiteliais através das *tight junctions* (TJs), formando desta maneira, uma barreira física, cuja função é permitir a passagem de nutrientes e fluídos e, proteger o hospedeiro contra micro-organismos patogênicos (Gersemann *et al.*, 2011). Estudos mostraram que as TJs desempenham um papel relevante nas IBDs, uma vez que pacientes com CD apresentam alterações na expressão de proteínas que compõem as TJs, como as claudinas-2, 5 e 8, levando à formação de uma barreira epitelial fraca e descontínua (Zeissig *et al.*, 2007). Ademais, citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IFN- γ , estão aumentadas em pacientes com IBD, e são capazes de alterar a função de barreira das TJs do epitélio intestinal. De fato, o tratamento de pacientes acometidos pelas IBDs com anticorpo anti-TNF- α foi efetivo em reduzir os sintomas clínicos da doença, devido à restauração das

funções de barreira das TJs, restabelecendo desta forma, a integridade da barreira epitelial (Suenart *et al.*, 2002).

Por fim, as células que compõem a barreira epitelial do intestino são responsáveis, também, pela indução da migração de células inflamatórias para o trato gastrointestinal (TGI) através da liberação de quimiocinas, como a CXCL8, ativando, desta forma, a resposta imune inata no local da inflamação, capaz combater os micro-organismos patogênicos e restaurar a homeostasia intestinal (Macdonald *et al.*, 2011).

1.4 Imunobiologia nas IBDs

Existem vários relatos na literatura indicando que o desequilíbrio entre os microorganismos presentes na flora intestinal, a barreira epitelial intestinal e a resposta imunológica do hospedeiro, está diretamente associado à iniciação e desenvolvimento das IBDs (Xavier e Podolsky, 2007).

No indivíduo saudável, por exemplo, o sistema imunológico intestinal é regulado de forma delicada e controlada, permitindo um equilíbrio com a flora intestinal. Por outro lado, em pacientes acometidos pelas IBDs, o funcionamento dos mecanismos imunoregulatórios ocorre de forma inadequada (Garrett *et al.*, 2010). O desenvolvimento de uma resposta imunológica desregulada nas IBDs é em grande parte mediada pela ativação desenfreada de células da resposta inflamatória como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos T (Baumgart e Carding, 2007b; Cassiano, 2009). Os mecanismos envolvidos na ativação dessas células envolvem a liberação de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, como: citocinas, quimiocinas e enzimas induzíveis, principalmente a ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase (NOS2), os quais coordenam a ação e amplificação do processo inflamatório intestinal devido a um processo de resolução deficiente (Sartor, 1994; Atreya *et al.*, 2000). De fato, estudos mostraram que o desequilíbrio entre a ativação de células T efetoras (as quais liberam citocinas pró-inflamatórias) e células T regulatórias (responsáveis pela liberação de citocinas anti-inflamatórias), está diretamente associado ao desenvolvimento das IBDs (Macdonald *et al.*, 2011; Hundorfean *et al.*, 2012). O processo de resolução envolve a supressão de mediadores pró-inflamatórios e da inflamação através da estimulação da produção e liberação de mediadores anti-inflamatórios como o TGF- β e IL-10 (Lawrence *et al.*, 2002). Além disso, mediadores endógenos, como as resolvinas, lipoxinas e protectinas, bem como a ativação de leucócitos, cujas células são capazes de remover células

inflamatórias e microorganismos patogênicos do local da lesão, exercem papel crucial para a manutenção da homeostasia do organismo (Lawrence *et al.*, 2002; Schwab e Serhan, 2006).

O sistema imunológico associado ao TGI é extremamente complexo, sendo formado por populações de células linfóides e não linfóides. No tecido linfóide da mucosa intestinal estão presentes linfócitos T e B, granulócitos, mastócitos e células Natural Killer (NK) (Mach *et al.*, 2005); Abbas *et al.*, 2008). Além disso, os enterócitos promovem o encontro entre os antígenos presentes no lúmen e as APCs presentes na mucosa, tais como as células dendríticas e macrófagos (Mach *et al.*, 2005). As células dendríticas são cruciais no controle da imunidade contra patógenos e na tolerância à flora comensal. Estas células possuem amplo espectro de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) como, os receptores do tipo TOLL (TLR) e receptores do tipo NOD (NLRs), os quais são capazes de reconhecer produtos bacterianos e distinguir bactérias patogênicas das comensais, além de ativar ou silenciar a resposta de células T (Magalhaes *et al.*, 2007). Uma vez que as células dendríticas entram em contato com os patógenos, ocorre o processo de maturação e posterior indução da resposta imunológica.

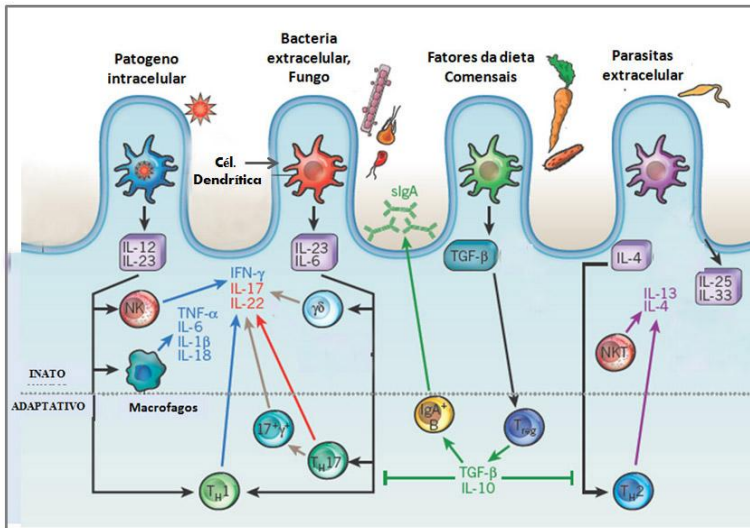
Na ausência de processo inflamatório e na presença da microflora comensal, há um balanço entre células efetoras e regulatórias, que permite o controle da produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Neste caso, no intestino do indivíduo saudável, as células dendríticas apresentam fenótipo imaturo e estimulam a diferenciação das células T naive em células T regulatórias CD4⁺, as quais liberam, de forma constitutiva, citocinas com características antiinflamatórias, como a IL-10 e o TGF- β . Estas citocinas limitam a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-23, bem como, reduzem a ativação de células Th1 e Th2 na mucosa intestinal, e por esta razão, são responsáveis por controlar a ativação excessiva de linfócitos e limitar a perpetuação do processo inflamatório (Banchereau e Steinman, 1998).

Entretanto, diante de um processo inflamatório agudo, ocorre ativação do sistema imunológico inato, o qual permite o controle dos patógenos através da ativação de células efetoras secundárias, como as células NK (responsáveis pela ativação de macrófagos), neutrófilos e APCs. As células do sistema imunológico inato estão presentes na mucosa intestinal e são capazes de reconhecer o agente invasor, promover a fagocitose, destruição dos microorganismos e, secretar

citocinas pró-inflamatórias, as quais estimulam a cascata inflamatória (Banchereau e Steinman, 1998).

Diante de um processo inflamatório exacerbado, ocorre a ativação da resposta imune adaptativa. A ativação da resposta adaptativa ocorre após as APCs reconhecerem os patógenos e apresentarem os fragmentos de antígenos aos linfócitos T CD4⁺ (naives), levando à diferenciação e à proliferação de células T efetoras (Th1, Th2 e Th17), as quais têm funções distintas na inflamação. A ativação dessas células resulta em uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias quando comparado à produção de citocinas anti-inflamatórias pelas células T regulatórias, gerando dessa forma, um desequilíbrio na homeostasia intestinal, que culmina com a exacerbação e perpetuação da resposta inflamatória (Iwasaki e Medzhitov, 2004). Além disso, durante o processo inflamatório, muitos leucócitos penetram no local da lesão através da vasculatura da mucosa e liberam quimiocinas, as quais atraem mais células inflamatórias para o sítio da inflamação e promovem a amplificação e perpetuação do processo inflamatório, através de um ciclo de retroalimentação positiva (Soehnlein *et al.*, 2009). Por outro lado, a fim de tentar recuperar a homeostasia intestinal, as células T CD4⁺ (naives), na presença de citocinas como TGF- β e IL-10, podem se diferenciar em linfócitos T regulatórios e controlar o processo inflamatório (Iwasaki e Medzhitov, 2004).

A figura 1 apresenta um esquema acerca do mecanismo imunoregulatório desencadeado mediante processo inflamatório instalado no intestino. Na figura em questão, é possível observar as principais células do sistema imune inato e adaptativo, as quais são ativadas diante de um processo inflamatório instalado no intestino, e os principais mediadores inflamatórios liberados por estas células.



Fonte: Adaptado de (Maloy e Powrie, 2011).

Figura 1: Mecanismo imunorregulatório desencadeado mediante processo inflamatório instalado no intestino. IEC, *Intestinal Epithelial Cell*; IL, interleucina; NK, *natural killer*; NKT, célula T *natural killer*; TNF, tumor necrosis factor; TGF, transforming growth factor.

A resposta das células T apresenta características diferentes entre os dois tipos principais de IBD. Em pacientes com UC há uma predominância de linfócitos CD4⁺ com células do fenótipo Th2, caracterizada pela alta produção de IL-4 e TGF- β . Por outro lado, na mucosa de pacientes com CD predomina a resposta do fenótipo Th1, que é caracterizada pela produção de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina-2 (IL-2) (Fuss *et al.*, 1996). Na CD, a resposta Th1 parece estar influenciada pelas células Th17, que são caracterizadas pela produção da interleucina-17 (IL-17) (Kolls e Linden, 2004). A produção desta citocina é estimulada pela IL-6, TGF- β e IL-23 e, por produtos secretados de neutrófilos e células apresentadoras de antígenos, especialmente as células dendríticas (Sartor, 2006). De fato, estudos demonstraram que tanto os níveis de IL-23 quanto de IL-17, encontram-se aumentados em tecidos de pacientes com CD (Shih e Targan, 2008; Dutra *et al.*, 2011b). Já o perfil da resposta das células T na UC é mais difícil de ser caracterizado. A produção das citocinas IL-4 e IL-5, as quais estão elevadas no tipo de resposta Th2, nem sempre é encontrado em altos níveis em tecidos com UC, o que torna a caracterização das IBD muitas vezes controversa (Fuss *et al.*, 1996). Contudo, o controle

do equilíbrio entre ativação de células T efectoras e regulatórias, bem como, da produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, é fundamental para a manutenção da homeostasia intestinal nos indivíduos acometidos pelas IBDs.

1.5 Alterações histopatológicas e manifestações clínicas das IBDs

Na UC, cuja doença acomete apenas a mucosa de forma contínua, a região afetada apresenta sinais de ulceração, hiperemia e hemorragia (Baumgart e Sandborn, 2007a). As alterações histopatológicas observadas no estágio inicial da doença incluem: infiltrado de células inflamatórias na lâmina própria, danos epiteliais e distorção das criptas. Na fase tardia, as células inflamatórias invadem as criptas intestinais e as destroem. Nessa fase, também é possível observar a perda de células caliciformes e edema na mucosa intestinal. Entretanto, diante de um processo inflamatório recorrente, o encurtamento do cólon é observado (Podolsky, 2002).

Na CD, caracterizada por uma inflamação crônica que acomete todo TGI, todas as camadas da parede intestinal são afetadas. Macroscopicamente, é possível observar o espessamento da mucosa intestinal, enquanto que na análise microscópica, os granulomas são evidentes. Além disso, pode-se observar a presença de denso infiltrado de células inflamatórias, pontos de ulceração, fibrose e presença de fístulas/fissuras (Baumgart e Sandborn, 2007a).

Os sinais clínicos da UC são principalmente, diarreia sanguinolenta e dor abdominal, e nos casos mais graves, febre e perda de peso. Na CD, as principais manifestações clínicas são febre, perda de peso, diarreia, frequentemente com presença de sangue e muco e, dor abdominal (Baumgart e Sandborn, 2007a). Portanto, a dor abdominal é uma manifestação clínica comum presente em ambas as formas das IBDs.

1.5.1 Dor abdominal: sintoma das doenças inflamatórias intestinais

A sensação dolorosa exerce um papel fisiológico, pois funciona como um sinal de alerta e nos permite deduzir e detectar qualquer ameaça à integridade física do organismo (Chapman e Gavrín, 1999). A percepção da dor ocorre pelo envio de um sinal após a ativação dos receptores sensoriais da dor, chamados nociceptores, frente a um estímulo que possui potencial de dano. A sensação dolorosa pode ser: transitória, quando a ativação dos nociceptores ocorre na ausência de dano tecidual; aguda, quando há uma lesão e consequente ativação dos

nociceptores no local da lesão, ou ainda, crônica, quando a dor é causada por uma lesão crônica ou em caso de doença, podendo perpetuar através de fatores que não os causadores da dor (Mendell e Sahenk, 2003).

Os nociceptores estão localizados na porção distal dos neurônios aferentes sensoriais e são amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (Chapman e Gavrin, 1999). Nas IBDs, a ativação dos nociceptores presentes nas vísceras do TGI inferior, como intestino delgado e cólon, é responsável por gerar o principal sintoma desta doença, a dor abdominal (McMahon *et al.*, 2005; Griffis *et al.*, 2006). Os neurônios mecanorreceptores existentes na musculatura lisa de todas as vísceras ocas estão presentes nas fibras do tipo A δ e C, e respondem a estímulos mecânicos, tensão aplicada ao peritônio, contração e distensão da musculatura lisa (Cervero e Laird, 1999; Gebhart, 2000). Esses neurônios são classificados em dois grupos: o grupo de baixo limiar de ativação, para estímulos mecânicos leves, e o grupo de alto limiar de ativação, para estímulos agressivos e não agressivos. O segundo grupo é encontrado no esôfago, sistema biliar, intestino delgado e cólon, enquanto que o primeiro está presente apenas, no esôfago e cólon (Cervero, 1991; Cervero e Janig, 1992).

Já é sabido que, alguns nociceptores viscerais são ativados apenas sobre condições específicas, como por exemplo, diante de um processo inflamatório (Cervero e Laird, 1999; Gebhart, 2000). Nesse caso, mediadores inflamatórios como, histamina, serotonina, cinina, citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas, são produzidos e liberados no local inflamado com a intenção de restaurar a homeostasia intestinal (McMahon *et al.*, 2005; Griffis *et al.*, 2006). A liberação destes mediadores é responsável pela sensibilização de receptores de alto limiar e de nociceptores silenciosos, previamente não-responsivos, os quais perfazem 40% a 45% da inervação visceral aferente do cólon (Knowles e Aziz, 2009). Estes neurônios nociceptivos contribuem para a tradução do sinal na dor visceral crônica, alterações prolongadas dos reflexos espinhais e da regulação autonômica anormal dos órgãos internos. A sensibilização desses receptores persiste mesmo após a cessação do estímulo nociceptivo, traduzida por alterações das funções motora e sensitiva (hiperalgesia visceral) (Cervero e Laird, 1999; Gebhart, 2000; Knowles e Aziz, 2009). Estudos mostraram que amostras de tecido de pacientes acometidos pelas IBDs apresentaram um aumento na expressão de receptores do tipo TRPV1 (do inglês, Transient

Receptor Potential Vanilloid 1), sugerindo o importante papel deste receptor na sensibilização de aferentes viscerais após um estímulo inflamatório (Yiangou *et al.*, 2001).

Recentemente, estudos mostraram o papel crucial dos neutrófilos na indução da hipernocicepção inflamatória. Cunha e colaboradores (2008) observaram que a migração de neutrófilos para o local inflamado está diretamente associada à cascata de eventos que leva a indução da hipernocicepção mecânica através da produção de mediadores hipernociceptivos de ação direta, como a prostaglandina E₂. Já é bem descrito na literatura que no modelo de colite experimental induzida pelo DSS, há um aumento da migração de células inflamatórias para o local da inflamação, e que, este aumento do infiltrado celular, está diretamente associado ao desenvolvimento das IBDs (Bento *et al.*, 2011a; Dutra *et al.*, 2011b). Dessa forma, corroborando com os estudos supracitados, o grupo de Verma-Gandhu (2007), observou que, no modelo de colite experimental induzida de forma aguda pela administração de DSS em camundongos, ocorreu aumento da migração de células inflamatórias, em especial de neutrófilos, para o sítio inflamatório e que, o aumento deste infiltrado celular, estava diretamente associado à indução da hiperalgesia visceral, cujo sintoma é comumente observado nos indivíduos acometidos pelas IBDs.

Sendo assim, considerando que o aumento da migração das células inflamatórias no intestino inflamado, e, conseqüentemente, aumento da liberação de mediadores inflamatórios no local, são aspectos fundamentais para a indução da hiperalgesia visceral, sugere-se que a regulação destes processos poderia representar um alvo importante para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas e para o tratamento dos sintomas associados às IBDs, como a dor abdominal.

1.6 Tratamento das IBDs

Os tratamentos atualmente empregados nas IBD servem apenas para atenuar os sintomas e seus efeitos dependem da severidade da doença. A terapia de primeira escolha no caso de IBDs, de leve a moderada, é o ácido 5-aminosalicílico (ASA, mesalazina), ou pró-drogas orais como sulfasalazina, olsalazina e balsalazida derivadas do ASA e, glicocorticoides, como a prednisona. Pode-se ainda, fazer a associação de corticosteróides como hidrocortisona, budesonida e beclometasona. A manutenção do tratamento, após atingir o estágio de remissão da doença, é realizada com a administração de imunomoduladores, como azatioprina (inibe a síntese do DNA) e

infliximabe (anticorpo monoclonal para o TNF- α) (Baumgart e Sandborn, 2007a).

No caso da UC, o procedimento cirúrgico (proctocolectomia) é indicado quando há uma situação que pode levar o indivíduo à morte como: perfuração do cólon, sangramento retal refratário e não responsividade à terapia medicamentosa. Entretanto, na CD, a cirurgia é indicada nos casos de formação de estruturas fibróticas que geram os seguintes sintomas: obstrução parcial ou completa do intestino, abscessos abdominais e fístulas enterovisciais e enterocutâneas. É preciso ressaltar que a cirurgia não é curativa, mas sim, uma alternativa para o tratamento das complicações e indução da remissão da doença (Baumgart e Sandborn, 2007a).

Até os dias de hoje, as opções terapêuticas de primeira escolha para o tratamento das IBDs apresentam eficácia limitada, além de inúmeros efeitos adversos, como, síndrome de Cushing, hipertensão, diabetes melitus, pancreatite, leucopenia, linfoma, e, infecções, e, por essa razão, a busca por terapias mais promissoras para o tratamento dessas doenças é extremamente necessária. A tabela a seguir (Tabela 1) apresenta alguns dos medicamentos mais recentes, que já são utilizados na terapêutica das IBDs:

Tabela 1: Compostos mais recentes utilizados para o tratamento das doenças inflamatórias intestinais.

Compostos terapêuticos	Alvo Terapêutico	Colite Ulcerativa	Doença de Crohn
Adalimumabe	TNF α	X	X
Golimumabe	TNF α , células T	X	
Basiliximabe	Interleucina 2	X	
Visilizumabe	Células T	X	
MLN-02	Integrina A4 β 7		X
Atlizumabe (MRA)	Interleucina 6		X
Tocilizumabe	IL-6		X
Certolizumabe	TNF α		X
Fontolizumabe	Interferon- γ		X
Filgrastina	Polimorfonucleares		X

Fonte: Triantafillidis *et al.*, 2011.

1.7 Modelos experimentais de doenças inflamatórias intestinais

A fim de tentar elucidar de forma mais consistente a patogênese das IBDs e buscar novas estratégias terapêuticas, inúmeros modelos animais foram desenvolvidos e têm sido amplamente utilizados. Os modelos experimentais utilizados como ferramenta para elucidar os aspectos importantes das IBDs são divididos em quatro categorias: modelo de colite espontânea, modelo de colite induzida por agentes químicos (ex: DSS e TNBS), modelo de transferência adaptativa e modelo de modificação genética (deleção gênica e transgênica) (Hibi *et al.*, 2002).

O modelo de colite induzida por agentes químicos é o modelo mais utilizado por apresentar características imunológicas e histopatológicas que mimetizam as características apresentadas pelos indivíduos que possuem algum tipo de IBDs (Clapper *et al.*, 2007). A indução da colite pelo agente químico DSS, foi primeiramente descrita em camundogos, em 1990, por Okayasu e colaboradores (Okayasu *et al.*, 1990). Neste modelo experimental, o DSS é diluído na água de beber dos animais geralmente em concentrações que variam entre 1-6% sendo oferecido *ad libitum* por vários dias. Entretanto, estudos de Bento (2012) (Bento, 2012) mostraram que a administração de DSS nas concentrações de 4 e 6% causa um baixo índice de sobrevivência dos animais ao final do primeiro ciclo de indução da colite experimental. O mecanismo pelo qual o DSS induz a colite experimental é ainda desconhecido, entretanto, sugere-se que esse processo ocorra devido à sua capacidade de romper a barreira epitelial intestinal, tornando-a mais permeável e, permitindo dessa forma, o encontro da microflora intestinal com os granulócitos presentes na mucosa subjacente (Kitajima *et al.*, 1999; Strober *et al.*, 2002). De fato, estudos mostram que o DSS altera a barreira epitelial intestinal antes mesmo do início da reação da colite. Além disso, observa-se que a indução de colite por DSS leva à ruptura das criptas intestinais três dias após a indução e, conseqüentemente, reduz a produção de glicoproteínas, aumentando dessa forma, a permeabilidade da barreira epitelial, sem mesmo apresentar algum sinal clínico de inflamação (Kitajima *et al.*, 1999). Nesse sentido, evidências suportam a ideia da importância, tanto da integridade da barreira epitelial intestinal, quanto da secreção de imunomoduladores pelas células epiteliais do intestino, na manutenção da homeostasia intestinal e prevenção do desenvolvimento das IBDs, uma vez que esta representa uma barreira física contra a invasão por patógenos (Kitajima *et al.*, 1999; Strober *et al.*, 2002).

O tipo de resposta celular apresentada na fase aguda deste modelo experimental parece estar relacionado, principalmente, à ativação do sistema imune inato, uma vez que estudos mostraram que mesmo sendo deficientes em células T e B, os animais podem desenvolver colite após a administração do DSS, sugerindo desta forma, que a resposta imune adaptativa não é muito expressiva para o desenvolvimento da colite experimental na fase aguda (Dieleman *et al.*, 1994; Wirtz *et al.*, 2007). Corroborando estes dados, estudos de Bento e colaboradores (2012) mostraram que, apenas na fase crônica do processo inflamatório intestinal induzido com DSS, a população de linfócitos TCD4⁺ estava aumentada, indicando mais uma vez que os linfócitos T parecem ter pouca participação na fase aguda de desenvolvimento da colite neste modelo experimental.

Outros dois agentes químicos utilizados para indução da colite experimental são o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) e o da oxazolona, os quais são administrados através da inserção de um catéter no cólon dos animais. Esses agentes químicos são diluídos em etanol, e a principal função é quebrar a barreira da mucosa intestinal, causando ulcerações e necrose no tecido do cólon, bem como, lesão das criptas intestinais, devido ao aumento do infiltrado celular na lâmina própria (Morris *et al.*, 1989; Wirtz *et al.*, 2007).

Em alguns modelos, a colite experimental se desenvolve espontaneamente. Nesses modelos, os genes que codificam receptores, proteínas e/ou fatores de transcrição responsáveis pelo controle do processo inflamatório sofrem mutação genética e, desta forma, o processo inflamatório é induzido espontaneamente (Takeda *et al.*, 1999; Wirtz e Neurath, 2000). Além disso, a deleção de genes responsáveis pela transcrição de citocinas, como por exemplo, camundongos “knockout” para os genes que codificam as citocinas IL-10 e IL-2, também promove o desenvolvimento da colite espontânea, devido à desregulação entre as células do sistema imune e a flora intestinal (Kuhn *et al.*, 1993; Sadlack *et al.*, 1993).

Por fim, o modelo de transfecção adaptativa também tem sido utilizado como uma ferramenta para a melhor compreensão dos mecanismos imunológicos envolvidos nas IBDs. Estudos demonstram que a transfecção de linfócitos T ativados são capazes de promover inflamação intestinal severa no intestino delgado e cólon dos animais, levando os animais à morte dentro de poucas semanas após a transfecção (Elson *et al.*, 1995; Steinhoff *et al.*, 1999).

Sendo assim, a utilização de modelos experimentais animais, os quais mimetizam as características das IBDs, são fundamentais para o

entendimento dos mecanismos fisiopatológicas destas doenças e, constituem ferramentas valiosas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento destas doenças.

1.8 Novas alternativas terapêuticas para o tratamento das IBDs

Conforme descrito anteriormente, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das IBDs, que combinem alta eficácia no tratamento e baixos efeitos indesejáveis se faz necessário, uma vez que os vários medicamentos utilizados atualmente não são seletivos para o tratamento destas doenças. Além disso, apesar de muitos pacientes responderem e se manterem remissivos com as terapias existentes, as opções disponíveis permanecem inadequadas para outros. Somando-se a isso, os estudos mais recentes ainda não fornecem dados suficientes sobre a total eficácia das novas terapias e de seus possíveis efeitos colaterais. Em resposta a demanda de novos medicamentos para a terapia das IBDs, os produtos naturais e componentes da dieta têm sido amplamente estudados para o tratamento e prevenção de distúrbios inflamatórios. Dentre esses, os compostos fenólicos são os componentes mais abundantes presentes na dieta dos humanos e são alvos de inúmeros estudos, os quais têm mostrado o papel fundamental desses compostos na modulação da resposta inflamatória intestinal (Galvez *et al.*, 2001; Comalada *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos são classificados em cinco grupos estruturais: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignanas e estilbenos. No presente trabalho, iremos abordar a atividade biológica de um composto pertencente ao grupo dos flavonoides, a miricitrina, e para tanto, nas próximas seções deste trabalho serão abordados aspectos relevantes apenas deste grupo.

1.8.1 Flavonoides: conceito e estrutura química

Os flavonoides são componentes essenciais das células de vegetais superiores e são responsáveis pela interação do vegetal com o ambiente. Regulam o metabolismo celular e crescimento do vegetal e promovem a fixação do nitrogênio necessário para o desenvolvimento da planta (Havsteen, 2002). Os flavonoides estão presentes em frutas, vegetais, grãos, chás e vinhos e, desta forma, podem ser ingeridos pelos mamíferos através da dieta. Estima-se que o consumo diário de

flavonoides por indivíduos saudáveis seja cerca de 1-2 g (Havsteen, 2002).

Flavonoides são gama-benzopironas, cuja estrutura química é composta por dois anéis aromáticos (anel A e B) ligados através de uma cadeia composta por três carbonos sendo que, a cadeia carbonada pode formar um anel pirano central com um dos anéis benzênicos (anel C). A figura 2 representa a estrutura química comum para os flavonoides. A maioria dos flavonoides apresenta-se na forma glicosilada, na qual uma ou mais porções monossacarídicas encontram-se ligadas à cadeia propiônica do composto. Os açúcares mais comumente ligados são a glicose e a ramnose, embora outros como galactose, arabinose e xilose também possam encontrar-se ligados a esses compostos (Havsteen, 2002). Na ausência desta ligação monossacarídica, o composto é chamado de aglicona. Os flavonoides são divididos em seis subgrupos dependendo do nível de oxidação no anel C do composto, são eles: flavonol, flavanol, flavanonas, flavonas, isoflavonas e antocianidinas (D'archivio *et al.*, 2007). Existem na literatura vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, onde são demonstradas as propriedades antioxidantes (Edenharder e Grunhage, 2003), analgésicas e antiinflamatórias dos flavonoides (Calixto *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2004).

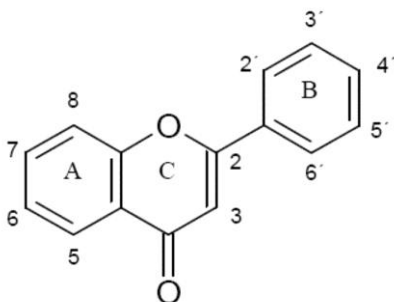


Figura 2. Estrutura química básica dos flavonoides.

1.8.2 Flavonoides: propriedades biológicas

Os flavonoides têm-se mostrado como potenciais agentes antioxidantes exógenos capazes de neutralizar e suprimir a produção de radicais livres como o anion superóxido (O_2^-), proteger os ácidos graxos insaturados presentes em membranas celulares e impedir a oxidação de antioxidantes endógenos (Zloch e Ginter, 1979; Haenen *et al.*, 1997; Pietta, 2000; Kostyuk *et al.*, 2003; Yokomizo e Moriwaki, 2005b), além de remover íons metálicos pesados, como por exemplo o cobre (Cu^{2+}) os quais têm a função de catalisar a formação de radicais livres (radicais hidroxil, dióxido de nitrogênio e anion superóxido) e a oxidação de biomoléculas (Halliwell e Gutteridge, 1990; Brown *et al.*, 1998).

Além disso, os flavonoides têm apresentado importante atividade antinociceptiva quando avaliados em diferentes modelos experimentais. Estudos mostram que alguns flavonoides são capazes de prevenir a dor causada por picadas de insetos, queimaduras ou cortes, através da inibição de fosfolipases e ciclooxigenases (Liang *et al.*, 1999; Havsteen, 2002). Além disso, há também relatos sugerindo o papel antinociceptivo dos flavonoides em diferentes modelos de dor experimental em camundongos, induzido pela administração de agentes nociceptivos como, administração intratecal de citocinas pró-inflamatórias e administração intraplantar do adjuvante completo de Freund (CFA), de glutamato, de PMA (do inglês, phorbol myristate acetate), da bradicinina e da capsaicina (Havsteen, 2002; Meotti *et al.*, 2006a; Meotti *et al.*, 2006b; Meotti *et al.*, 2007b). Ademais, a ação antinociceptiva dos flavonoides foi também observada no modelo de dor neuropática induzida pela constrição do nervo ciático em camundongos (Meotti *et al.*, 2006a). Além dos efeitos periféricos, os flavonoides parecem exercer seus efeitos analgésicos por atuarem sobre o sistema nervoso central, através da ação estimulante dos receptores adenosinérgicos, bem como do receptor para o GABA, sensíveis aos benzodiazepínicos (Medina *et al.*, 1997; Paladini *et al.*, 1999).

Outra propriedade biológica já bem caracterizada para os flavonoides é sua ação anti-inflamatória que tem sido observada em diferentes modelos experimentais tanto *in vivo*, como *in vitro* (Middleton *et al.*, 2000; Havsteen, 2002). Estudos vêm demonstrando que os flavonoides possuem importantes atividades anti-inflamatórias devido as suas ações neutralizadoras sobre os radicais livres e reguladoras da produção de eicosanoides, através da inibição de metaloproteinases de matriz, que estão intimamente relacionadas com o processo inflamatório (Sartor *et al.*, 2002), ou por meio da inibição de

enzimas como proteases e fosfolipases, as quais inibem a hidrólise e geram os segundos mensageiros responsáveis pela transdução do sinal e, consequentemente, ativação do processo inflamatório (Kyo *et al.*, 1998; Mantle *et al.*, 1999). Adicionalmente, os flavonoides são capazes de inibir algumas enzimas envolvidas na cascata inflamatória como, 5-LOX e COX2, além de inibirem moléculas reguladoras da expressão gênica e a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), responsável pela expressão de diversos mediadores inflamatórios (Chen *et al.*, 2000; Raso *et al.*, 2001; Calixto *et al.*, 2003; Santangelo *et al.*, 2007; Romier *et al.*, 2008; Romier *et al.*, 2009). Os mecanismos descritos na literatura para ação anti-inflamatória dos flavonoides estão associados a sua capacidade de competir com o ATP pelo sítio de ligação em quinases intracelulares (Middleton *et al.*, 2000), o que torna esses compostos importantes inibidores das PI3Ks e PKCs (Agullo *et al.*, 1997; Gamet-Payraastre *et al.*, 1999). Além disso, os flavonoides são capazes de inibir a fosforilação das MAPKs e a ativação do NF- κ B, que por sua vez, inibem a liberação e expressão de citocinas pró-inflamatórias (Wadsworth *et al.*, 2001; Xagorari *et al.*, 2001). Entretanto, embora as proteínas quinases estejam envolvidas na via de sinalização intracelular ativada pela PI3K, grande parte desses estudos mostram que a inibição das MAPKs pelos flavonoides ocorre de forma independente dessa via. Além do exposto, os flavonoides podem inibir a síntese de prostaglandinas e a secreção de serotonina e histamina pelos mastócitos, sendo empregados no controle de processos alérgicos como rinite e asma crônica (Frostad, 1977; Havsteen, 2002).

Considerando suas atividades antioxidantes e antiinflamatórias, os flavonoides têm sido avaliados contra inúmeras doenças as quais estão diretamente relacionadas aos processos oxidativos e inflamatórios como diabetes, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças inflamatórias crônicas, como, as doenças inflamatórias intestinais (Scalbert *et al.*, 2005; Romier *et al.*, 2009).

1.8.3 Atividade antiinflamatória dos flavonoides nas doenças inflamatórias intestinais

Conforme descrito anteriormente, estudos comprovaram que os flavonoides apresentam inúmeras atividades biológicas, dentre estas, atividade antiinflamatória, a qual foi demonstrada em diferentes modelos experimentais (Calixto *et al.*, 2003; Edenharder e Grunhage, 2003; Calixto *et al.*, 2004; Santangelo *et al.*, 2007). Nesse sentido, estudos têm sido realizados a fim de avaliar o possível papel anti-

inflamatório dos flavonoides em diferentes modelos experimentais de IBD. Na **Tabela 2**, são apresentados os principais estudos *in vitro*, os quais foram realizados em diferentes linhagens celulares do epitélio intestinal de humanos ou roedores, e, na **Tabela 3**, são apresentados os estudos *in vivo*, utilizando a colite experimental induzida pela administração de indutores químicos de inflamação intestinal como, o sulfato sódico de dextrana (DSS) e o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

Tabela 2: Estudos *in vitro* da atividade de alguns flavonoides sob a liberação de produtos relacionados ao desenvolvimento de processos inflamatórios como, as doenças inflamatórias intestinais.

FLAVONOIDE	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO	TIPO CELULAR	ESTÍMULO	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
QUERCETINA	Inibiu a ativação de NF-Kb; Reduziu a secreção de IL-8	EIC DE Humanos (HT-29)	TNF- α	Kim e colaboradores (2005a)
QUERCETINA	Inibiu a expressão de COX-2 e a produção de NO	Caco-2	IL-1 β	(O'leary <i>et al.</i> , 2004)
LUTEOLINA APIGENINA	Bloqueio da ativação/fosforilação Akt; Redução da secreção de IP-10; Inibição atividade NF- κ B	Célula epitelial intestinal de murino (Mode-K)	TNF- α	Ruiz e Haller (2006)
GENISTEÍNA	Redução da secreção de IP-10;	Célula epitelial intestinal de murino (Mode-K)	TNF- α	(Romier <i>et al.</i> , 2008)
GENISTEÍNA	Inibiu a produção de IL-8	Caco-2	LPS, IL-1 β , TNF- α	Romier <i>et al.</i> , 2008

Legenda da Tabela 2: IP-10: do inglês *Interferon gamma-induced protein 10*; MIP-2: do inglês *macrophage inflammatory protein 2-alpha*; IL-: interleucina; I κ B α : inibidor da ativação do NF- κ B; Caco-2: linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano; LPS: lipopolissacarídeo; TNF- α : fator de necrose tumoral-alpha; Akt: do inglês *serine/threonine-specific protein kinase*; COX-2: ciclooxigenase 2; NO: óxido nítrico; NF- κ B: fator de transcrição nuclear- κ B.

Tabela 3: Estudos da atividade antiinflamatória de alguns flavonoides em modelo de colite experimental *in vivo*.

FLAVONOIDE	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO	MODELO ANIMAL	INDUTOR	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA
BAICALEÍNA	Reduziu a severidade da colite	Camundongos	DSS	Hong et al., (2002)
SILIMARINA	Reduziu a severidade da colite e níveis de MPO Inibiu a enzima 5-lipoxigenase Reduziu a formação de LTB4	Ratos	TNBS	(Cruz <i>et al.</i> , 2001)
MORINA	Reduziu a severidade da colite e níveis de MPO Reduziu os níveis de IL-1 β e LTB4 Inibiu a atividade de iNOS	Ratos	TNBS	Galv�ez et. al., (2001)
RUTINA (glicosideo de quercetina)	Reduziu a severidade da colite Reduziu os níveis de IL-1 β Reduziu a expressão do RNAm IL-6 e IL-1 β .	Camundongos	DSS	Kwon et. al., (2005)
QUERCITRINA A (glicosídeo de quercetina)	Reduziu a severidade da colite e níveis de MPO Restaurou os níveis de glutaciona Suprimiu a ativa�o de NF- κ B Reduziu a atividade NOS2	Ratos	DSS	Kwon et. al., (2005)
CATEQUINA	Reduziu a severidade da colite e níveis de MPO	Ratos	TNBS	Kwon et. al., (2005)

Legenda da Tabela 3: TNBS: do inglês, 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid; DSS: do inglês, *dextran sodium sulfate*; MPO: mieloperoxidase; NOS2: enzima óxido nítrico sintase induzida; PG: prostaglandina; LTB4: leucotrieno B4; NF- κ B: fator de transcri o nuclear- κ B; IL- : interleucina.

1.8.4 Miricitrina

A miricitrina (**Figura 3**) é um flavonoide encontrado em frutas de vegetais do gênero *Pouteria* (marmelo) e da espécie *Manilkara zapota* ('sapodilha') (Ma *et al.*, 2003), e em grandes quantidades em folhas de plantas do gênero *Eugenia* (pitanga e jabolão) (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1987). A miricitrina pertence ao subgrupo flavonol e sua estrutura química é formada por dois grupos fenil (A e B) que são unidos por uma cadeia propiônica (C) no qual está ligado um açúcar, no caso a ramnose. Estudos mostraram que as três oxidrilas livres no anel B (grupo pirrogalol) são importantes para o desenvolvimento das atividades antioxidante, neutralizadora de radicais livres, pró-apoptótica, e inibidoras de proteínas quinases e peroxidases deste flavonoide (Brown *et al.*, 1998; Gamet-Payraastre *et al.*, 1999; Pietta, 2000; Kostyuk *et al.*, 2003; Ko *et al.*, 2005).

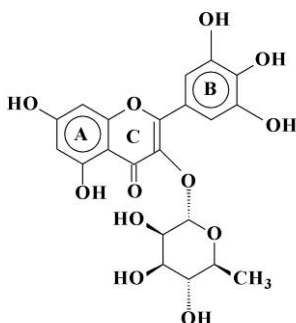


Figura 3: Estrutura química da miricitrina.

Estudos em humanos mostraram que a ingestão de alimentos compostos por miricitrina leva ao aumento dos níveis de lipoproteínas de alta densidade e à redução dos níveis de triglicédeos (Kimira *et al.*, 1998). Além disso, estudos descrevem as atividades antioxidantes e neutralizadoras de radicais livres para a miricitrina (Edenharder e Grunhage, 2003; Yokomizo e Moriwaki, 2005b). Estudos realizados *in vitro* mostraram que a miricitrina foi capaz de inibir a produção de NO, através da regulação da expressão de NOS e da ativação de NF-κB induzida por LPS de *Escherichia coli* (Chen *et al.*, 2000), enquanto que, estudos *in vivo*, demonstraram uma importante atividade antinociceptiva da miricitrina nos modelos de dor neuropática crônica e

na dor inflamatória persistente (Meotti *et al.*, 2006a; Meotti *et al.*, 2006b; Cordova *et al.*, 2011). Mais recentemente, Pereira e colaboradores (2011) relataram o efeito antipsicótico da miricitrina em doses que não induzem catalepsia nos animais. Além disso, a miricitrina, quando avaliada em camundongos, demonstrou ser um composto ansiolítico (Fernandez *et al.*, 2009).

Estudos realizados com a miricetina (aglicona da miricitrina) mostraram seu efeito anticancerogênico e anti-inflamatório em células de carcinoma retal através da inibição da PKC α , redução da expressão de metaloproteínas de matriz, fosforilação da ERK1/2 e a expressão da c-Jun (Ko *et al.*, 2005). O efeito inibitório sobre a PKC e PI3K (fosforila a PKC) parece estar diretamente associado à presença das três oxidrilas livres no anel B, o que torna os flavonoides miricitrina e sua aglicona, os mais potentes inibidores, do grupo dos flavonoides, de ambas as classes das proteínas quinases, a PKC e a PI-3K. Esses dados confirmam os dados apresentados por Meotti e colaboradores (2006a e 2006b), cujo grupo mostrou que a miticitrina foi capaz de promover analgesia em modelos experimentais de dor em camundongo por meio da inibição da ativação de duas isoformas da PKC, α e ϵ .

Apesar de inúmeros estudos descreverem com clareza as principais vias pelas quais os flavonoides exercem seus efeitos anti-inflamatórios, a forma com que estes compostos são absorvidos pelo TGI, se na sua forma íntegra (glicosilada), hidrolisada (aglicona) e/ou na forma de metabólitos, bem como, a identificação da forma ativa dos mesmos, é apresentada de maneira bastante contraditória na literatura, e por essa razão, ainda é foco de muitas pesquisas. Dessa forma, o estudo do perfil farmacocinético destes compostos é de suma importância para a melhor compreensão da sua atividade farmacológica, eficácia e segurança.

1.9 Farmacocinética: conceitos

Para que um fármaco exerça o efeito esperado é necessário que o mesmo chegue ao tecido-alvo na concentração adequada, após a sua administração. Deste modo, a farmacocinética é a área que estuda a velocidade de todas as etapas que um medicamento sofre desde sua administração até sua excreção do organismo. O estudo da farmacocinética de um composto compreende as seguintes etapas: absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME) e é de extrema relevância para o entendimento de sua atividade farmacológica (Lin e

Lu, 1997; Meibohm e Derendorf, 1997; Graefe *et al.*, 2001; Budha *et al.*, 2008; Vugmeyster *et al.*, 2012).

A absorção de um composto representa a passagem do fármaco do local de administração para a corrente sanguínea (Lin e Lu, 1997; Graefe *et al.*, 2001; Vugmeyster *et al.*, 2012). Esta etapa pode ser influenciada por diversos fatores como: via de administração, propriedades físico-químicas do fármaco e fatores relacionados ao paciente (Lin e Lu, 1997). A biodisponibilidade de uma droga é definida como a fração da droga administrada que atinge à circulação sistêmica após sua administração. Em geral, os efeitos de primeira passagem (processo de biotransformação do fármaco que pode ocorrer, na parede do intestino, no sangue mesentérico e, principalmente, no fígado, antes atingir o local de ação) e a alta lipofilicidade de um composto diminuem a sua biodisponibilidade (Lin e Lu, 1997; Graefe *et al.*, 2001; Vugmeyster *et al.*, 2012).

Após absorção, o fármaco é distribuído no corpo através da circulação. Os padrões de distribuição de um fármaco dependem de alguns fatores fisiológicos, como fluxo sanguíneo tecidual, transporte através da membrana celular, bem como, das propriedades físico-químicas do composto (Lin e Lu, 1997; Budha *et al.*, 2008). Fármacos com alto peso molecular e com características mais polares apresentam baixa velocidade de distribuição, uma vez que estas características dificultam seu transporte através das membranas celulares (Hug, 1978; Lin e Lu, 1997; Budha *et al.*, 2008). Outro fator limitante da distribuição de um fármaco é a sua ligação às proteínas plasmáticas, capazes de diminuir seu acesso ao meio intracelular, e consequentemente, alterar a sua biodisponibilidade (Lin e Lu, 1997). Por outro lado, fármacos que apresentam características físico-químicas ideais como, baixo peso molecular e boa solubilidade em meio aquoso, passam facilmente através da membrana endotelial e apresentam velocidade de distribuição dependente da taxa de perfusão. Dessa forma, estes compostos são primeiramente distribuídos para os órgãos altamente perfundidos como o pulmão e, em seguida, para os de menor perfusão, como o tecido adiposo (Hug, 1978; Lin e Lu, 1997).

Os principais processos que determinam a eliminação de um composto são a biotransformação e a excreção (Hug, 1978). O processo de biotransformação/metabolização de um fármaco ocorre através de diversas reações químicas, intermediadas por diferentes enzimas do organismo, as quais são responsáveis pela transformação do composto original em moléculas mais hidrofílicas (solúveis), facilitando dessa forma, a sua eliminação do organismo e/ou reduzindo a sua toxicidade

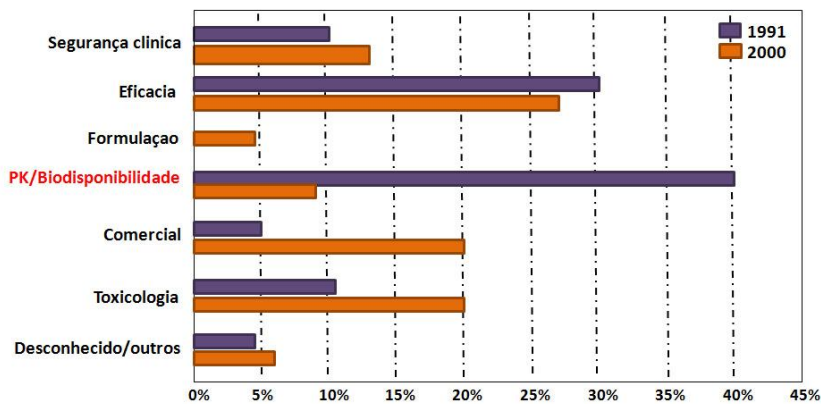
(Hug, 1978; Lin e Lu, 1997; Budha *et al.*, 2008). Por outro lado, o processo de biotransformação pode ainda converter um fármaco administrado na sua forma inativa em uma forma ativa, ou mesmo, produzir metabólitos muitas vezes mais ativos, e até mesmo, mais tóxicos, que a forma original administrada (Hug, 1978; Lin e Lu, 1997; Budha *et al.*, 2008). A estes compostos, os quais se tornam ativos após processo de biotransformação no organismo, chamamos de pró-drogas. A excreção é a passagem do composto da corrente sanguínea para o meio externo, processo em que os compostos são efetivamente eliminados do organismo (Hug, 1978; Lin e Lu, 1997; Budha *et al.*, 2008). Os principais órgãos de excreção de fármacos são rins, pulmões, suor, glândulas lacrimais e salivares, mama (leite materno) e tubo digestivo (fezes e secreção biliar) (Hug, 1978).

1.10 Importância do estudo farmacocinético de novas drogas durante a fase pré-clínica do desenvolvimento farmacêutico

Os estudos de farmacocinética, durante a fase pré-clínica de desenvolvimento de um fármaco constituem uma das etapas mais relevantes na pesquisa de um novo medicamento, pois, fornecem as bases necessárias para selecionar e aperfeiçoar as moléculas promissoras, e, ao mesmo tempo, permitem reconhecer e descartar as moléculas inviáveis, reduzindo os custos e o tempo gasto, para colocar no mercado, um medicamento que tenderia ao fracasso (Lin e Lu, 1997). Nesse contexto, dados da literatura mostraram que muitas falhas observadas no desenvolvimento de novos medicamentos são atribuídas às propriedades farmacocinéticas indesejáveis dos compostos como, baixa absorção e extensa metabolização (efeito de primeira-passage), nos casos em que o metabólito formado é inativo. Um estudo publicado por Gombar e colaboradores (2003) mostrou que cerca de 50% dos insucessos ocorridos durante a Investigação de Novas Drogas (IND) são atribuídos às propriedades inadequadas de ADMET. Prentis e colaboradores (1988) mostraram que, no final da década de 80, cerca de 60% das novas moléculas que estavam em estudos pré-clínicos no Reino Unido, foram excluídas já nas etapas iniciais de desenvolvimento. Os principais motivos para a falha no desenvolvimento dessas moléculas foram relacionados as suas propriedades farmacocinéticas inadequadas (39,4%) e à falta de eficácia clínica (29,3%).

Tal fato se repetiu na década de 90 e foi fator determinante para a reestruturação das etapas de estudo e desenvolvimento de novos medicamentos. Atualmente, as indústrias preferem realizar um estudo

farmacocinético prévio da droga, durante a fase pré-clínica, através de ensaios *in vivo* e *in vitro*, a fim de evidenciar qualquer problema relacionado à ADME, que inviabilizaria a continuação do estudo desta molécula. Dessa forma, e conforme mostrado na Figura 4, a farmacocinética passou a representar uma menor proporção na causa das falhas no desenvolvimento de novos medicamentos. A **Figura 4** mostra que, em 1990, a farmacocinética representava 40% das falhas no



desenvolvimento de novos medicamentos e, no ano de 2000, esta porcentagem foi reduzida para menos que 10%.

Fonte: rmi-pharmacokinetics.com/Pharmacokinetics.asp

Figura 4: Razões para falha no desenvolvimento de novas drogas.

Contudo, estes dados mostram que o sucesso no desenvolvimento de um novo medicamento está intimamente relacionado com a alta biodisponibilidade, eficácia clínica, e, baixa toxicidade do composto. Por esta razão, o estudo do perfil farmacocinético de um novo composto candidato a medicamento é extremamente importante, desde as etapas de desenvolvimento pré-clínico.

1.11 Determinação do perfil farmacocinético de um composto

1.11.1 Uso de HPLC-MS para quantificação de compostos em matriz biológica

Para a determinação do perfil farmacocinético de um composto, primeiramente, é necessária a escolha do método analítico que será

utilizado para a correta identificação e quantificação deste composto, em matriz complexa. Dentre os métodos analíticos, o mais comumente utilizado é a cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), acoplada ao espectrômetro de massas (do inglês, *Mass Spectrometry*, MS).

A cromatografia líquida é um método físico-químico de separação, no qual os componentes de uma mistura migram de forma diferencial devido a diferentes interações entre as duas fases imiscíveis que compõem o sistema, a fase móvel (mistura de diferentes solventes ou tampões aquosos) e a fase estacionária (adsorvente fixado em uma coluna cromatográfica) (Lough, 1995). Ao saírem da coluna, os compostos eluídos passam por um detector o qual emite um sinal elétrico que é registrado em forma de cromatograma. A grande variedade de combinações entre a fase móvel, a fase estacionária, bem como, a disponibilidade de uso dos diversos detectores existentes no mercado, tornam essa técnica extremamente versátil e de grande aplicabilidade (Lough, 1995). A técnica da HPLC tem sido muito utilizada, para análise, separação e quantificação de compostos em matrizes complexas, como extratos de plantas, fluídos biológicos, análise de efluentes dentre outros (Lough, 1995; Degani, 1997).

Os avanços nos campos da cromatografia instrumental, espectroscopia e espectrometria, aumentaram as possibilidades analíticas com relação à sensibilidade e à seletividade, permitindo a detecção de pequenas quantidades de compostos em matrizes complexas (Pereira, 2005). Nesse contexto, destaca-se a espectrometria de massas, a qual é fortemente empregada na indústria farmacêutica para a pesquisa, desenvolvimento e controle de qualidade de novos fármacos e cosméticos (Pereira, 2005). O desenvolvimento de técnicas de ionização à pressão atmosférica, tais como a ionização química à pressão atmosférica (“APCI”) e a ionização por eletrosbulização (“electrospray, ESI”) possibilitaram a união viável e efetiva de duas poderosas ferramentas analíticas, a espectrometria de massas (MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cuja associação torna o método ainda mais robusto. A HPLC-MS é aplicável a uma grande variedade de matrizes devido às inúmeras vantagens, como a simplicidade da preparação da amostra (na maioria dos casos não necessita a execução de uma etapa de derivatização) e o tempo de análise, que pode ser inferior a 5 min (Pereira, 2005).

Apesar dos grandes avanços analíticos e da alta tecnologia empregada atualmente nas técnicas cromatográficas, sempre que um método cromatográfico é escolhido para a análise e quantificação de um

composto em matriz complexa, o mesmo precisa ser padronizado e validado para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (Degani, *et al.*, 1997).

1.11.2 Padronização e validação de métodos cromatográficos empregados para análise de um composto em matriz biológica.

O método analítico empregado para a determinação quantitativa de uma droga e/ou seus metabólitos em amostras biológicas é o principal determinante na geração de dados reprodutíveis e confiáveis, os quais são utilizados para a avaliação e interpretação de dados relacionados ao perfil farmacocinético destes compostos (Shah *et al.*, 2000; Ribani, 2004).

A padronização de um método analítico compreende uma das etapas mais críticas no desenvolvimento de ensaios bioanalíticos e consiste da escolha de todos os parâmetros cromatográficos que serão utilizados para a eficiente identificação e quantificação do composto de interesse (Shah *et al.*, 2000). Os parâmetros cromatográficos que devem ser determinados são: escolha da fase móvel e fase estacionária, determinação do método de calibração (padronização interna ou externa), seleção da técnica de extração da molécula da matriz biológica e a escolha do tipo de detector que irá compor o sistema cromatográfico.

A validação de um método analítico é definida como um processo empregado para garantir a qualidade do método analítico utilizado, a fim de assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade do mesmo (Ribani, 2004). Uma validação completa é aquela que garante que o método utilizado é reprodutível, independente do local onde será realizado e do analista que fará a análise (Ribani, 2004). As agências reguladoras, como a ANVISA (Brasil) e o FDA (EUA) definiram os parâmetros necessários para a validação de um método analítico, os quais foram uniformizados pela ICH (*International Conference on Harmonization*) (I.C.H, 1995; Cassiano, 2009). Desta forma, essas agências possuem credenciamento para julgar a validação de um método analítico.

Os parâmetros necessários para a validação de um método analítico envolvem: Especificidade/Seletividade, Linearidade, Exatidão, Precisão (repetitividade e reprodutividade), Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ), Recuperação e Robustez (F.D.A, 2001; Brasil, 2003; Ribani, 2004; Cassiano, 2009).

Embora estudos prévios mostrem a importante atividade anti-inflamatória dos flavonoides nos modelos de colite experimental, até hoje, nenhum estudo foi realizado a fim de verificar a atividade anti-

inflamatória da miricitrina nestes modelos experimentais. Além disso, considerando as propriedades farmacológicas da miricitrina já mencionadas neste trabalho, é surpreendente que, até o momento, nenhum estudo do perfil farmacocinético deste composto tenha sido realizado. Desta maneira, o presente estudo buscou avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da miricitrina em um modelo de colite experimental e determinar o perfil farmacocinético deste flavonoide em roedores.

2 HIPÓTESE

Tendo em vista os inúmeros trabalhos supracitados, realizados *in vitro* ou *in vivo*, os quais mostraram o efeito anti-inflamatório dos flavonoides nas IBDs e, considerando que a atividade biológica da miricitrina já foi descrita em diferentes modelos experimentais, aventamos a hipótese de que a miricitrina, quando administrada por via oral, poderia apresentar ação anti-inflamatória em modelos experimentais de inflamação intestinal. Assim como descrito para a maioria dos flavonoides glicosilados, sugerimos que a forma ativa da miricitrina, responsável pela sua ação farmacológica, seja a sua molécula aglicona e/ou os demais metabólitos formados a partir da sua biotransformação no organismo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos, anti-inflamatório e antinociceptivo, da miricitrina no modelo experimental de colite induzida pelo DSS em camundongos, investigar o (s) possível (is) mecanismo (s) de ação anti-inflamatória neste modelo experimental, e, validar o método cromatográfico para determinar o perfil farmacocinético da miricitrina em plasma de roedores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar os sinais da doença e o dano macroscópico e microscópico nos animais com colite experimental induzida pelo DSS, tratados ou não, com miricitrina pela via oral;
2. Investigar o possível mecanismo de ação anti-inflamatória da miricitrina no modelo de colite aguda induzida por DSS em camundongos, através da expressão e da quantificação de mediadores inflamatórios, os quais estão diretamente associados com o desenvolvimento das IBDs;
3. Avaliar o possível efeito antinociceptivo da miricitrina no modelo de colite aguda induzida por DSS;
4. Validar o método e os parâmetros cromatográficos para a quantificação da miricitrina em plasma e avaliar os parâmetros de farmacocinéticos em roedores;
5. Identificar os compostos presentes nas amostras de plasma e tecido colônico de camundongos após 7 dias de tratamento oral com miricitrina.
6. Definir a forma ativa da miricitrina através do estudo de correlação entre a atividade farmacológica da miricitrina em modelo de nocicepção induzida por PMA na pata dos camundongos e seu perfil farmacocinético;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Para a avaliação da atividade farmacológica da miricitrina no modelo de colite experimental, e para a análise do perfil farmacocinético da miricitrina em camundongos, foram utilizados camundongos da linhagem CD1 machos pesando entre 20 – 25 g, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC). Os experimentos foram realizados durante a fase clara do ciclo (06:00-18:00). Todos os protocolos foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA, processo número PP00496 e PP00470, respectivamente).

Para determinação do perfil farmacocinético da miricitrina em ratos, foram utilizados ratos da linhagem Sprague-Dawley, machos, pesando entre 300 – 350 g, provenientes do Charles Riever (Wilmington, MA, USA). Os experimentos foram realizados de acordo com o guia e a política de uso do Comitê Institucional de uso e cuidados com animais (IACUC, do inglês, Institutional Animal Care and Use Committee) da Universidade da Flórida, Gainesville, USA, e foram previamente aprovados (IACUC, processo número 200903598).

Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), além de livre acesso a água.

4.2 Indução da colite experimental aguda pelo DSS

A colite experimental induzida por DSS foi realizada através da administração de sulfato sódico de dextrana (DSS, de peso molecular: 36,000-50,000, obtido da ICN Biomedicals, Solon, OH, EUA) na água de beber. Os animais receberam DSS na concentração de 3%, em água filtrada, *ad libitum*, por um período de cinco dias consecutivos, seguido por um período de dois dias recebendo apenas água filtrada (Wirtz *et al.*, 2007). Durante todo o experimento, os animais foram monitorados e, ao final do sétimo dia de experimento, os animais foram eutanasiados. Imediatamente após, os cólons foram coletados, lavados em solução salina (0,9 %), pesados e seus comprimentos mensurados. Os tecidos colônicos foram armazenados em freezer -70 °C para análises bioquímicas ou, alternativamente, armazenados em formaldeído

tamponado a 4 % em temperatura ambiente até o processamento das amostras para análise histológica.

4.3 Tratamento

Com o objetivo de avaliar o efeito do flavonoide miricitrina na colite induzida pelo DSS, os animais foram tratados pela via oral (p.o.) nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg de peso corporal, uma vez ao dia, do dia 0 ao dia 7. O composto miricitrina foi dissolvido 5% de Tween 80 e, então, diluído em solução salina (0,9 %). A solução veículo (5% Tween 80 + solução salina 0,9%) foi utilizada para o tratamento dos animais controle designados neste trabalho como: grupo “veículo”, o qual recebeu apenas água durante todo protocolo experimental, e o grupo “veículo + DSS 3%” que recebeu DSS 3% na água de beber durante 5 dias, seguido de mais 2 dias com água *ad libitum*.

4.4 Índice de atividade da doença (IAD)

Durante o protocolo experimental da colite induzida pelo DSS, os animais foram examinados diariamente em relação ao índice de atividade da doença (IAD) (Cooper *et al.*, 1993; Ghia *et al.*, 2008). O IAD é o somatório combinado de escores referentes à perda de peso corporal, consistência fecal e presença de sangue nas fezes. Os escores foram definidos de acordo com os seguintes parâmetros: a consistência das fezes foi pontuada como escore 0 para ausência de diarreia e fezes consistentes; escore 2 para fezes frouxas e mal formadas; e escore 4 para diarreia e fezes muito aquosas. A presença de sangue nas fezes foi avaliada como escore 0 para ausência de sangue nas fezes; escore 2 para a presença de sangue oculto (Feca-cult, INLAB, SP, Brasil); ou escore 4 para sangue evidente nas fezes. A perda de peso corporal foi avaliada como escore 0 para ausência de perda de peso ou perda de até 1 % do peso inicial dos animais; 1 para perda de peso de 1-5 %; escore 2 para perda de peso de 5-10 %; escore 3 para perda de peso de 10-15%; e escore 4 para perda de peso maior que 15 % do peso inicial.

4.5 Dano macroscópico

No sétimo dia após o início do tratamento com DSS, os animais foram eutanasiados, os cólons removidos e abertos longitudinalmente (em toda a extensão) e cuidadosamente limpos com solução salina 0,9

%. A gravidade do dano ao cólon foi avaliada utilizando-se uma escala de dano macroscópico conforme a tabela abaixo:

Tabela 4 - Grade de escores para avaliação do dano macroscópico total na colite induzida por DSS.

CONSISTÊNCIA DAS FEZES PRESENTES NO CÓLON	
Escore	Avaliação
0	Normal (bolos fecais bem formados).
1	Bolos fecais úmidos e frouxamente formados.
2	Bolos fecais amorfos, úmidos e pegajosos.
3	Diarréia.
<i>*Presença de sangue visível nas fezes: somar +1 ao escore.</i>	
DANO AO CÓLON	
Escore	Avaliação
0	Sem sinais de inflamação.
1	Inflamação leve, hiperemia localizada.
2	Inflamação moderada ou distribuída mais amplamente.
3	Inflamação severa e/ou distribuída extensivamente.
4	Úlceras penetrantes e lesões sanguinolentas.

Fonte: (Kimball *et al.*, 2004; Kimball *et al.*, 2006).

4.6 Escore microscópico

Os tecidos colônicos coletados dos grupos: veículo, veículo + DSS3% e DSS 3% + miricitrina (10 mg/kg, v.o.), foram incorporados em parafina e os cortes histológicos (5 µm) foram utilizados para confecção das lâminas. Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas e submetidas à coloração com hematoxilina e eosina (H&E). As amostras histológicas dos tecidos colônicos foram analisadas em microscópio óptico (Nikon Eclipse 50i, Melville, NY, EUA). A inflamação intestinal foi quantificada de acordo com a escala proposta por Van der Sluis e colaboradores (2006) como apresentado na tabela abaixo:

Tabela 5: Escore histológico para quantificação do grau de inflamação intestinal.

Critério	Score				
	0	1	2	3	4
Células calciformes	--	↓	↓↓	↓↓↓	↓↓↓
Espessamento da mucosa	--	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Células inflamatórias	--	↑	↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Infiltração celular na submucosa	--	--	↑	↑↑	↑↑↑
Destruição da arquitetura	--	--	--	↑	↑↑↑
Úlceras	0%	0-25%	25-50%	50-75%	75-100%
Abcessos nas criptas	0	1-3	4-6	7-9	> 10

Fonte: Van der Sluis e colaboradores (2006).

Os escores obtidos em cada parâmetro (graduados conforme a intensidade de cada um) foram somados para a quantificação do dano microscópico total. Foram analisados três cortes histológicos obtidos do cólon de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído por no mínimo quatro animais. As análises foram realizadas por dois investigadores de forma independente.

4.7 Dosagem de citocinas

Os níveis teciduais de IL-6 e CXCL1/KC, foram avaliados como descrito anteriormente (Bento *et al.*, 2011a; Dutra *et al.*, 2011b), com poucas modificações. Resumidamente, os cólons foram removidos e homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, composição: NaCl 137 mM, KCl 2 mM e tampão fosfato 10 mM, pH 7,2-7,4) contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de fenilmetilsulfonila 0,1 mM, cloreto de benzometônio 0,1 mM, EDTA sódico 10 mM, e

aprotinina A 2 ng/ml. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -70 °C até o momento da análise. A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Lowry (1951). Os resultados foram expressos como a quantidade de citocina por miligrama de proteína da amostra. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se Kits específicos de ELISA (do inglês, *enzyme-linked immuno-sorbent assay*), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8 Análise imunoistoquímica

Para as reações de imunohistoquímica, os cortes teciduais do cólon, de espessura de 5 µm, foram mantidos em estufa a uma temperatura de 70-90 °C até a completa fusão da parafina ao redor dos cortes. Posteriormente, os tecidos foram desparafinizados em xilol (xileno) e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, etanol 80 % e finalmente etanol 70 %). O bloqueio da peroxidase endógena dos tecidos foi realizado com o objetivo de eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas falso-positivas. Para tanto, as lâminas foram imersas em uma solução de peróxido de hidrogênio a 1,5 % em metanol absoluto (v/v) por 20 minutos, com posterior lavagem em água destilada. Previamente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formaldeído e parafina. Para este fim, foi preparada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M; pH 6,0. As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada, e mantidas em banho-maria ajustado para 95-98°C, durante 45 minutos. Logo após, ainda como parte do processo de reativação antigênica através do calor, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos à temperatura ambiente, e posteriormente lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, estas foram submersas em PBS.

Os anticorpos primários, anti-fosfo-p65 NFκB (1:50), anti-fosfo-ERK (1:300), anti-COX-2 (1:50), anti-fosfo-p38 (Thr 182) (1:100), anti-fosfo-JNK (G-7) (1:300) e anti-nPKCε (C-15)(1:100) foram diluídos em solução Diluente® (Biocare Medical, Concord, CA, EUA). A solução contendo o anticorpo foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida a uma

temperatura de 2-8 °C, durante 12-16 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS à temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários biotinizados (Envision Plus, ready-to-use) por uma hora a temperatura ambiente, e em seguida, submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial, através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3-Diaminobenzidina (DAB). Após a revelação, foram realizadas as seguintes etapas: contracoloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris; desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, etanol 80 %, 90 % e etanol absoluto); diafanização em xilol e montagem em Entellan[®]. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (câmera digital, Sight DS-5M-L1, conectada a microscópio óptico Eclipse 50i, ambos da Nikon, Melville, NY) e a aquisição das imagens foi realizada através do software Qcapture Pro 5.1; QImaging (Surrey, BC, Canada). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Foram analisados de três a quatro cortes histológicos da amostra de cada animal, sendo que cada grupo experimental foi constituído de, no mínimo, três animais. Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias. Todos os grupos experimentais foram processados sob as mesmas condições experimentais. As configurações para aquisição das imagens foram idênticas para todos os tecidos. As imagens foram transferidas para um computador onde a intensidade da coloração dos pixels, para cada anticorpo, foi calculada para cada imagem utilizando o software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

4.9 Extração do RNA total

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos pelo kit SV Total RNA Isolation System Z3100 (Prômege, Madison, WI, EUA). Para isso, 70 -100 mg de tecido foram homogeneizados com 1 ml de RNA Lysis Buffer, com auxílio de homogeneizador portátil, em tubo de centrifuga de 5 ml de capacidade. Em seguida 175 µl de lisado obtido, foram adicionados 350 µl de *RNA dilution buffer* e as amostras foram incubadas a 70°C por 3 minutos, seguindo centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos. Os sobrenadantes contendo o RNA total foram transferidos para novo tubo de microcentrifuga (1,5 ml) contendo 200 µl de etanol 95 % (Merk, Alemanha). Após homogeneização, as amostras foram transferidas para uma coluna de filtração e foram centrifugadas a 13.000 x g por 1

minuto. O RNA total retido no filtro foi lavado com 600 μ l de *RNA wash solution*. Após centrifugação a 13.000 x g por 1 minuto, foi adicionado diretamente sobre as membranas das colunas de filtração o mix de DNase contendo: 40 μ l de *yellow core buffer*, 5 μ l de MnCl₂ 0,09 M e 5 μ l de DNase I enzyme, seguindo incubação por 15 minutos a 25 °C. Foram então adicionados 200 μ l de *DNase stop solution* sobre as membranas e as amostras foram centrifugadas a 13.000 x g por 1 minuto. Novamente, as membranas foram lavadas com 600 μ l de *RNA wash solution* e centrifugadas a 13.000 g por 1 minuto. As colunas foram então transferidas para novos tubos de microcentrífuga e o RNA total foi eluído com 100 μ l de água livre de nucleases, com centrifugação a 13.000 x g por 1 minuto. A concentração e a pureza do RNA foram determinadas em espectrofotômetro NanoDrop 1100 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Alemanha). O RNA foi aliquoteado e estocado em freezer a -70 °C até o momento do uso.

4.10 Confeção do DNA complementar (reação de transcrição reversa)

A fim de determinar a expressão do RNAm codificador para a ciclooxigenase-2 (COX-2), sintase do óxido nítrico 2 (NOS2), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interleucina (IL)-6, no cólon de camundongos, foi realizado o ensaio de transcrição reversa seguido pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Para a reação da transcrição reversa, as amostras contendo 100 ng de RNA total foram incubadas com 1 μ l de oligo dT 15, 1 μ l do mix de dNTP (10 mM) e com água ultra pura para um volume final de 12 μ l. Essas amostras foram aquecidas por 5 minutos a 65 °C, resfriadas por 5 minutos a 4 °C e acrescidas de 4 μ l de tampão de primeira fita (Tris-HCl 250 mM, pH 8.3, KCl 375 mM e MgCl₂ 15 mM), 2 μ l de DTT 0,1 mM, e 1 μ l de inibidor de RNase (2500 U). Posteriormente, essa mistura foi incubada a 37 °C por 2 minutos e a enzima M-MLV (1 μ l, 200 U) adicionada. Após a adição da enzima, as amostras foram mantidas a 37 °C por 50 minutos e a inativação da reação foi realizada por incubação a 75°C por 15 minutos. O DNA complementar (DNAc) foi estocado a 4 °C até a realização da reação de PCR em tempo real.

4.11 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNAC foi amplificado em duplicata utilizando o kit Master Mix TaqMan® Universal PCR, com sondas e probes específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para COX-2(Mm01307334_g1), NOS2(Mm01309898_m1), TNF- α (Mm00443258_m1) e IL-6 (Mm99999064_m1), e marcação MGB e VIC para o GAPDH (NM_008084.2), o qual foi utilizado como controle endógeno. A reação de PCR foi realizada em uma placa de reação óptica de 96 poços. Cada reação continha: 1 μ l de DNAC, 5 μ l de master mix, 0,5 μ l de cada sonda (alvo + controle endógeno) e 3 μ l de água ultrapura, em um volume final de 10 μ l. As amplificações foram realizadas em um termociclador (StepOne Plus, Applied Biosystems) para 50 ciclos. A fluorescência foi coletada a cada ciclo de amplificação e os dados foram analisados utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para a quantificação relativa.

4.12 Obtenção e cultura primária de macrófagos derivados da medula óssea

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos da linhagem CD1 foram sacrificados por meio de deslocamento cervical e tiveram seus fêmures e as tíbias extraídos. A extremidade proximal e distal destes ossos foi seccionada e injetada com 3 ml de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) sem soro em cada osso. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 1.000 r.p.m. por 10 minutos, e o precipitado foi ressuscitado em 10 ml/por animal de DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), e então submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 μ m (BD FALCON). Logo em seguida, as células foram ressuscitadas em 2 ml de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em uma câmara de Neubauer.

As células extraídas da medula foram diferenciadas em macrófagos plaqueando-as em placas de 6 poços na concentração de 2×10^5 células/poço. As células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO), 1% de HEPES 1 M (GIBCO) e 20% de sobrenadante de cultura de L929 filtrado (LCCM, *L929 cell conditioned medium*), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos). As placas foram então incubadas a 37 °C e sob atmosfera com 5% de CO₂. Quatro dias após o

plaqueamento das células, o meio de cultura foi trocado por um novo contendo também 20% de LCCM.

4.13 Estimulação, incubação e coleta dos macrófagos derivados da medula óssea

Dez dias após o plaqueamento das células, os macrófagos foram isolados e incubados em placa de 96 poços 2 x 10⁵ células/poço a 37°C em 5 % de CO₂ e estimulados com lipopolissacarídeo (Wu *et al.*), na concentração de 1 µg/ml por 24 horas, na presença ou ausência de, miricitrina (100 µM/poço) e miricetina (forma aglicona da miricitrina) nas concentrações de 10 e 100 µM/poço. Além disso, os compostos de interesse foram adicionados separadamente a poços contendo meio de cultura sem a presença de células (macrófagos) e serviram de controle para verificar se os compostos poderiam alterar o meio de cultura e com isso interferir na leitura dos dados. Vinte e quatro horas após a incubação as placas foram centrifugadas a 200 x g por 10 minutos, e os sobrenadantes resultantes foram congelados a -70 °C para posterior dosagem de citocinas.

A citocina TNF-α foi dosada pelo método de ELISA conforme descrito anteriormente para o doseamento de citocinas.

4.14 Avaliação da hiperalgesia secundária

Para a avaliação da atividade anti-nociceptiva da miricitrina sobre a hiperalgesia secundária em camundongos causada pela colite, os animais foram colocados em compartimentos de acrílico transparentes individuais (7 x 9 x 11 cm), localizados em uma plataforma de arame elevada, de modo a permitir o fácil acesso ao abdômen para aplicação de estímulos mecânicos. A indução da colite foi realizada conforme protocolo descrito no subitem 4.2, da seção *Materiais e Métodos*, do presente trabalho. Entretanto, a dose de miricitrina, administrada aos animais experimentais pela via oral, foi de 30 mg/kg. Os camundongos dos três grupos experimentais (Grupo veículo sem indução com DSS 3%, grupo veículo + Indução com DSS3% e grupo tratado + indução com DSS3%) foram aclimatizados por pelo menos 2 horas antes dos testes comportamentais. O limiar de retirada e/ou contração do abdômen dos animais foi medido através da aplicação consecutiva de filamentos de von Frey variando a força do filamento: 0.008, 0.02, 0.04, 0.07, 0.16,

0,4, 0,6, 1,0, 1,4, 2,0 g (VFH, Stoelting). Inicialmente, a aplicação no abdômen dos animais partiu de um filamento cuja força era de 0,6 g. O aumento ou a redução da força do filamento aplicado dependeu da resposta anterior gerada pela aplicação de determinado filamento de Von Frey. Os estímulos foram aplicados perpendicularmente à superfície do abdômen dos animais por um período máximo de 2 s, ou até que o animal apresentasse uma resposta nociceptiva de retirada do abdômen, caracterizado por salto imediato após a aplicação do filamento, estiramento abdominal, lambida do abdômen ou retração abdominal. Para análise do decurso temporal da hiperalgesia mecânica, os dados foram coletados no dia anterior ao início da indução da colite e após o início do tratamento com DSS 3%, em intervalos de 48, 72 e 144 horas (2º, 4º e 6º dias após o início da indução). Os dados foram apresentados a partir da média do limiar de retirada/contração do abdômen obtida quando filamentos de Von Frey, de diferentes forças, foram aplicados (10 aplicações/medida) no abdômen dos animais (Souza *et al.*, 2002).

4.15 Padronização do método analítico para a quantificação da miricitrina em plasma de roedores

Os estudos de padronização, validação e determinação do perfil farmacocinético da miricitrina em plasma de camundongo, foram realizados no LAFEX, no departamento de farmacologia da UFSC, sob supervisão do Dr. João Batista Calixto. Entretanto, a padronização, validação e estudo de farmacocinética da miricitrina em plasma de rato foram realizados no laboratório da Dra. Veronika Butterweck, em colaboração com o Dr. Reginald Frye, na Universidade da Flórida, na cidade de Gainesville (Flórida, EUA), durante o estágio de doutorado “sanduíche”.

4.15.1 Preparação das soluções estoque e de trabalho

As soluções de estoque da miricitrina, epicatequina (padrão interno, PI, para a validação analítica em plasma de camundongo) e quercetina (padrão interno, PI, para o método de validação em plasma de rato) foram preparadas em metanol na concentração de 1 mg/mL. As soluções de trabalho dos padrões internos epicatequina e quercetina foram diluídas em metanol para uma concentração final nas amostras de plasma de 250 ng/mL e 200 ng/mL, respectivamente. As soluções de trabalho da miricitrina, foram preparadas a partir da diluição da solução

estoque em metanol, nas concentrações de 20,0 µg/mL para validação do método em plasma de camundongo e de 16,0 µg/mL para validação em plasma de rato, as quais representam uma concentração 10 vezes mais alta que o ponto mais alto da curva de calibração. Para a preparação das demais soluções que compõem a faixa de trabalho, foram realizadas diluições seriadas (1:1 em metanol).

Para o procedimento de validação, foram selecionadas 3 concentrações diferentes, compreendidas na faixa da curva de calibração, as quais são conhecidas como amostras controle de qualidade (do inglês, *quality control*, QC). Para tanto, foram selecionadas uma concentração baixa (do inglês, *Low Quality Control*, LQC), uma média (do inglês, *Medium Quality control*, MQC) e uma alta (do inglês, *High Quality Control*, HQC). Para a validação em plasma de camundongo, foram escolhidas três concentrações da curva de calibração: 0,062 µg/mL (LQC), 0,25 µg/mL (MQC) e 1,0 µg/mL (HQC). Para a validação em plasma de rato foram escolhidas amostras com concentrações intermediárias da curva de calibração: 0,075 µg/mL (LQC), 0,8 µg/mL (MQC) e 1,2 µg/mL (HQC). Além dessas concentrações escolhidas, também foi selecionado o ponto correspondente à concentração do limite de quantificação do método analítico, no caso, 0,025 µg/mL (do inglês, *Lower Limit of Quantification*, LLOQ) e uma amostra QC de diluição (Dil-QC) na concentração de 1,0 µg/mL (concentração final em plasma). As soluções de trabalho das amostras QC foram preparadas a partir da diluição da solução estoque de miricitrina em metanol, conforme descrito anteriormente para preparação das amostras da curva de calibração, ou seja, 10 vezes mais concentrada que a amostra final em plasma. No caso da amostra QC de diluição (Dil-QC), a solução de trabalho foi preparada na concentração de 100 µg/mL. A amostra Dil-QC serve para garantir a confiabilidade do resultado apresentado a partir do procedimento de diluição de uma amostra. O procedimento de diluição deve ser aplicado quando uma amostra coletada de animal, após administração do composto, apresentar concentração superior ao último ponto da curva de calibração.

4.15.2 Condições instrumentais e cromatográficas

A análise de identificação e quantificação da miricitrina em plasma de camundongo foi realizada pelo sistema cromatográfico CLAE-MS 2010AV Shimadzu® (Kioto, Japão), composto sistema de detecção por espectrometria de massas modelo LC-MS 2010AV

equipado com uma interface *eletrospray* (ESI) e compreendido por um analisador do tipo quadrupolo simples. A voltagem do capilar do ESI foi de 1,6 kV, e, a temperatura da CDL e do bloco aquecedor foi de, 250°C e 200°C, respectivamente. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização na vazão de 1,5 mL/min. O espectrômetro de massas foi operado no modo negativo de ionização. Para as análises de quantificação da miricitrina e PI em plasma de camundongo, foi utilizado o modo SIM (selective ion monitoring), e os íons monitorados foram: m/z 289, para o PI e m/z 463 para a miricitrina. Como fase estacionária foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 Shimadzu® (150 x 2,1mm, 5 μ m) acoplada a uma guarda coluna (5 μ m, 5mm x 2.0mm; Shimadzu), e a fase móvel utilizada foi a mistura de ácido fórmico 0,1% (A) e metanol contendo 0,1% de ácido fórmico (B), com um fluxo de 0,2 mL/min. O perfil de eluição foi: 0-24 minutos: 5-56% de B (linear); 24-25 minutos: 56% de B (isocrático); 25-28 minutos: 56-5% de B (linear); 28-33 minutos: 5% de B (isocrático). Para a aquisição dos dados e quantificação das amostras foi utilizado o software LCMS Solutions (Shimadzu®, Kioto, Japão).

O sistema cromatográfico empregado para identificação e quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de rato foi um LC-MS/MS, compreendido de um amostrador automático de HPLC Surveyor, bomba quaternária do MS Surveyor, e espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo (TSQ, do inglês, *Triple Stage Quadrupol*, Quantum Discovery) (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). O espectrômetro de massas TSQ Quantum estava equipado com uma fonte de ionização *eletrospray* (ESI) e foi operado no modo íon negativo. Os parâmetros do aparelho são: voltagem da ESI, 3,4 kV e voltagem da fonte CID (do inglês, *collision induced dissociation*), 5 V. O gás nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização e gás auxiliar (35 e 10 respectivamente, unidade arbitrária). A energia de colisão foi 48 eV para miricitrina e 24 eV para o PI. O instrumento foi operado no modo de resolução com a largura do pico (largura total à meia-máxima, FWHM) definido como 0,7 m/z para ambos, quadrupolo (Q) 1 e Q3. O esquema de monitorização da reação selecionada seguiu a transição do íon precursor para o íon produto selecionado com os seguintes valores: m/z 463 \rightarrow 270, para a miricitrina e m/z 301 \rightarrow 150 para a quercetina. A coluna cromatográfica utilizada foi a Gemini C18 (50 mm x 2 mm, 5 μ m), semi-micro (Phenomenex, Torrance, CA, USA). A fase móvel consistiu de um gradiente linear de água + ácido acético 1 mM (fase móvel A) e acetonitrila:metanol (50:50) + ácido acético 1 mM (fase

móvel B), sobre uma taxa de fluxo de 250 $\mu\text{L}/\text{min}$. As amostras foram injetadas no modo “full loop injection”, e o loop utilizado foi de 20 μL . O perfil de eluição foi do tipo gradiente (de 10 à 90% de fase móvel B), compreendido num tempo total de análise de 5,5 minutos. A aquisição dos dados e quantificação das amostras foi realizada com auxílio do software Xcalibur Versão 1.4 (ThermoFisher Scientific, San Jose, CA, USA). As amostras foram analisadas em temperatura ambiente.

4.15.3 Preparação das amostras em plasma

Para preparação das amostras em plasma de camundongo, um “pool” de plasma branco de camundongos machos (sem tratamento com a miricitrina) foi coletado através do método de punção cardíaca. A partir das soluções de trabalho, os pontos da curva de calibração e as amostras QC em plasma de camundongo foram preparados através do seguinte protocolo: 180 μL de plasma de camundongo foram enriquecidos com 20 μL de solução de trabalho de miricitrina, 20 μL de solução de trabalho do padrão interno, 20 μL de ácido fosfórico 0,1% e 1,8 mL de acetona grau HPLC. A amostra foi então agitada por 90 segundos, centrifugada (14000 rpm, 4°C, 15 minutos) e o sobrenadante foi evaporado em banho-maria a 37°C sobre fluxo de nitrogênio gasoso. Após evaporação, o resíduo foi ressuspensionado com 200 μL de metanol, centrifugado novamente para retirar qualquer resíduo sólido ainda presente na amostra. O volume de injeção da amostra no sistema LC-MS foi de 30 μL . As amostras QC, nos três níveis de concentração, foram preparadas da mesma forma que as amostras da curva de calibração. A faixa empregada para a construção da curva de calibração em plasma de camundongo foi de 0,062-2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para a preparação das amostras em plasma de rato, o “pool” de plasma branco de ratos machos, foi obtido comercialmente da empresa BioChemed (Winchester, VA, EUA). As amostras QC e a curva de calibração em plasma de rato foram preparadas a partir das soluções de trabalho previamente preparadas. Para tanto, o seguinte protocolo foi utilizado: 150 μL de plasma de rato foram enriquecidos com 15 μL de solução de trabalho de miricitrina, 10 μL de solução de trabalho do padrão interno, 10 μL de ácido acético 0,56 M e 600 μL da mistura de acetonitrila:metanol (1:3) grau HPLC. As amostras foram então agitadas por 10 minutos, centrifugadas (4000 rpm, 4°C, 15 minutos), e o sobrenadante foi evaporado em banho-maria a 37°C sobre fluxo de nitrogênio gasoso. Após evaporação, o resíduo foi ressuspensionado com 150 μL de metanol, centrifugado novamente para retirar qualquer

resíduo sólido na amostra. A amostra foi injetada no sistema LC-MS/MS, no modo de injeção “full loop” (loop de 20 μL). As amostras QC, nos três níveis de concentração, foram preparadas em plasma de rato da mesma forma que as amostras da curva de calibração. A amostra Dil-CQ foi preparada a partir da solução de trabalho preparada na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Para tanto, a amostra foi diluída com plasma branco na proporção 1:10 e a partir de então, 15 μL dessa diluição foi diluída novamente com plasma branco para um volume final de 150 μL , que passou pelo mesmo procedimento de extração, acima mencionado, como as demais amostras. A faixa da curva de calibração em plasma de rato foi de 0,025-1,6 $\mu\text{g/mL}$.

4.16 Validação do método analítico

Os métodos utilizados para as análises da miricitrina em plasma de camundongo e de ratos foram validados de acordo com as recomendações da ANVISA (Guia para validação de métodos analíticos, resolução RE n°899)(Brasil, 2003) e do FDA (Bioanalytical Method Validation Guidance)(F.D.A, 2001).

4.16.1 Seletividade

Para a determinação da seletividade do método analítico utilizado foram injetadas no HPLC-MS e HPLC-MS/MS, as seguintes amostras:

- a) amostra padrão de miricitrina + padrão interno epicatequina diluído em solvente orgânico em concentrações conhecidas;
- b) amostra padrão da miricitrina + padrão interno quercetina diluído em solvente orgânico em concentrações conhecidas;
- c) amostra do plasma branco de camundongo após passar pelo procedimento de extração (sem adição do composto de interesse e padrão interno), e
- d) amostra do plasma branco de rato após passar pelo procedimento de extração.

4.16.2 Linearidade

A linearidade de um método é avaliada através da curva de calibração, preparada em matriz biológica, que corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental

(área/altura da banda/pico cromatográfico, obtido para o analito em análise) e, a concentração deste analito (Brasil, 2003; FDA, 2001).

Para tanto, as curvas de calibração foram preparadas em triplicata, tanto para plasma de camundongo como de rato, a partir da diluição seriada das soluções de trabalho conforme descrito na *seção 4.15.1*. Após o procedimento de extração previamente descrito (*item 4.15.3*) dos compostos da matriz biológica, as amostras foram analisadas por LC-MS ou LC-MS/MS. A curva de calibração é obtida em função da razão entre a área do pico gerado para cada concentração de miricitrina na amostra e a área do pico gerada para o padrão interno presente nesta mesma amostra *em função das respectivas* concentrações nominais ou de referência. A partir da análise dos dados foi gerada a equação da reta: $y = ax + b$, sendo “y” a resposta medida, “x” a concentração, “a” a inclinação da curva de calibração (coeficiente angular) e “b” a intersecção com o eixo y (coeficiente linear). A determinação da linearidade do método foi realizada através do coeficiente de correlação linear (R^2) gerado.

4.16.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O LD e LQ em plasma de camundongo foram determinados pelo método baseado na curva analítica. Primeiramente, o valor mínimo da curva de calibração foi determinado a partir da injeção de soluções padrão de miricitrina em concentrações decrescentes e conhecidas, até que a integração do pico não fosse mais visível no cromatograma. A faixa da curva de calibração para determinação do LD e LQ em plasma de camundongo foi de 0,062-0,5 ug/mL. A curva de calibração foi preparada em triplicata. Após injeção das amostras, foi gerada a equação da reta e os respectivos valores do coeficiente angular (*a*) e do coeficiente linear (*b*), para cada uma das curvas de calibração. Em seguida, foi calculada a média e os valores do desvio padrão de *b* (*Sb*) e do desvio padrão de *a* (*Sa*), os quais foram aplicados às seguintes formulas para calcular o LD e LQ:

$$LD = 3,3 \times Sb/Sa \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = 10 \times Sb/Sa \quad (\text{Equação 2})$$

Os limites de detecção e quantificação da miricitrina em plasma de rato foram determinados a partir do método de inspeção visual. Para tanto, amostras de miricitrina em baixas concentrações foram adicionadas em plasma de rato, extraídas conforme o método descrito na *seção 4.15.3*, e analisadas por HPLC-MS/MS. O LD foi considerado aquele em que a menor concentração da miricitrina pode ser detectada (considerando a relação sinal/ruído igual a 3,3). O LQ do método foi definido como a menor concentração injetada que permitiu a quantificação da amostra, ou seja, que pode ser integrada, e que apresentava valores de reprodutibilidade dentro dos limites aceitáveis ($\leq 15\%$).

4.16.4 Ensaio de Recuperação

A recuperação determina a eficiência da técnica utilizada para extrair o analito de interesse de uma matriz complexa (FDA, 2001; Thompson, 2002; Brasil, 2003).

A determinação da eficiência de extração do composto miricitrina do plasma de camundongo foi realizada a partir da análise comparativa entre as soluções QC da miricitrina (LQC, MQC e HQC) preparadas em solvente orgânico e as soluções QC, nas mesmas concentrações, preparadas em plasma. As soluções de trabalho das amostras QC foram preparadas como descrito na *seção 4.15.1*. As amostras QC preparadas em plasma foram extraídas conforme o método padronizado e descrito anteriormente (*seção 4.15.3*). As amostras foram preparadas em quintuplicata e analisadas por LC-MS conforme descrito na *seção 4.15.2*. Os dados obtidos foram analisados e a recuperação foi calculada de acordo com a equação:

$$\% R = \frac{\text{Valor obtido}}{\text{Valor real}} \times 100 \quad (\text{equação 3})$$

Valor obtido = a área do pico obtido da miricitrina após extração da matriz biológica.

Valor real = área do pico obtido da miricitrina quando adicionados em solvente orgânico, sem procedimento de extração.

Para avaliar a eficiência de extração do composto miricitrina do plasma de rato, os 3 níveis de concentração utilizados foram: 0,075 µg/mL (LQC), 0,25 µg/mL (MQC) e 1,2 µg/mL (HQC). As soluções de trabalho foram preparadas como descrito na *seção 4.15.1*. Em seguida, amostras de plasma de rato (plasma branco) foram enriquecidas com as amostras QC de miricitrina e posteriormente extraídas conforme o método descrito anteriormente (*seção 4.15.3*). Além disso, amostras de plasma branco de rato, contendo apenas ácido acético 0,56M (20µL), foram submetidas ao mesmo procedimento de extração, e o resíduo final obtido foi ressuspensão, separadamente, com solução padrão de miricitrina, preparada em metanol, nas respectivas concentrações das amostras QC. As amostras de cada nível de concentração foram preparadas em quintuplicatas. As amostras foram analisadas por HPLC-MS/MS, conforme as condições instrumentais descritas na *seção 4.15.2*. A recuperação do método foi calculada pela mesma equação utilizada para calcular a recuperação em plasma de camundongo (equação 3), entretanto, neste caso, o “**Valor obtido**” corresponde a área do pico obtido da miricitrina quando a mesma foi adicionada ao plasma ANTES da sua extração (pré-extração), e, o “**Valor real**” corresponde a área do pico obtido para a miricitrina quando a mesma foi adicionada APÓS o procedimento de extração (pós-extração) do plasma branco.

O ensaio de recuperação para o PI foi realizado em plasma de rato. Para tanto, a solução de trabalho do PI foi preparada conforme descrito na *seção 4.15.1*, e, adicionada ao plasma de rato (concentração final do PI = 0,200 µg/mL). Em seguida, a amostra foi extraída pela técnica de extração descrita anteriormente (*seção 4.15.3*). Além disso, amostras de plasma branco de rato sem adição do PI, passaram pelo mesmo processo de extração e o resíduo resultante foi ressuspensão com solução padrão do PI, preparada em metanol, na mesma concentração final. As amostras foram preparadas em quintuplicatas. Para o cálculo da recuperação do PI, a mesma equação utilizada para o cálculo da recuperação da miricitrina em plasma de rato (equação 3), foi utilizada. Nesse caso, o “valor obtido” e o “valor real” representam a área do pico gerada para o PI, quando adicionado pré-extração e pós-extração, respectivamente.

4.16.5 Efeito de Matriz em Plasma de Rato

O estudo do efeito de matriz é a análise da possível interferência da matriz biológica na ionização/eluição do composto de interesse no método analítico utilizado (FDA, 2001).

A determinação do efeito de matriz foi realizada apenas em plasma de rato utilizando-se o método de adição pós-extração. Para tanto, amostras de plasma branco adicionados de ácido acético 0,56M foram extraídas conforme descrito na seção 4.15.3 e ressuspensas em solução padrão de miricitrina, preparada em metanol, nas concentrações correspondentes as amostras QC. Os resultados obtidos foram comparados com a análise das amostras padrão de miricitrina, nas mesmas concentrações das amostras QC, as quais foram preparadas em metanol. As amostras foram injetadas no equipamento (LC-MS/MS) e analisadas conforme método descrito na *seção 4.15.2*. As amostras foram preparadas em quintuplicata. Desta forma, para calcular o efeito de matriz, o resultado gerado da área do pico da miricitrina (QC) quando adicionada após extração, foi comparado com a área do pico gerado para amostras QC preparadas apenas em solvente orgânico, através da *equação 3*, sendo que, neste caso, o “**Valor obtido**” corresponde a área do pico obtido da miricitrina, quando adicionada após o procedimento de extração do plasma branco, e o “**Valor real**” corresponde a área do pico obtido da miricitrina quando a mesma foi apenas diluído em solvente orgânico.

O ensaio do efeito de matriz também foi realizado para o PI em plasma de rato. Para tanto, o plasma branco de rato foi processado conforme descrito anteriormente e, após o procedimento de extração, o resíduo foi ressuspensado com solução padrão do PI (para uma concentração final de 0,200 µg/mL) preparada em metanol. Além disso, amostras contendo o PI, na mesma concentração acima descrita, foram preparadas apenas em metanol. As amostras foram preparadas em quintuplicata. O cálculo do efeito de matriz do PI em plasma de rato foi realizado da mesma forma que para o cálculo do efeito de matriz da miricitrina.

4.16.6 Precisão

Para verificar a precisão dos métodos analíticos empregados para análise da miricitrina em plasma de camundongo e no plasma de rato, foram preparadas as soluções de trabalho para a curva analítica, e, soluções de trabalho para as amostras QC conforme descrito na seção 4.15.1. O plasma branco dos roedores foi enriquecido com as respectivas soluções de trabalho da curva analítica e amostras QC (contendo os respectivos PIs, nas concentrações finais de 0,20 e 0,25 µg/mL para plasma de rato e camundongo), e, em seguida, submetidas ao processo de extração de acordo com o método descrito na *seção*

4.15.3. Após processamento das amostras, as mesmas foram analisadas no equipamento conforme método já descrito (*seção 4.15.2*). As amostras QC foram processadas em quintuplicata (plasma de camundongo) ou em sextuplicatas (plasma de rato), enquanto que a curva de calibração, para ambos os métodos, foi preparada em duplicata.

Para determinação da repetibilidade que analisa a precisão entre as amostras de mesma concentração processadas no mesmo dia (precisão intra-dia), utilizou-se o cálculo do coeficiente de variação (% CV). Para tanto, primeiramente a curva de calibração resultante para plasma de camundongo e plasma de rato foi calculada, e, a partir da equação da reta gerada pela curva de calibração foi possível determinar a concentração encontrada de cada amostra QC injetada. Após calcular a concentração de cada amostra injetada, a média e o desvio padrão da média, para cada nível de QC (LLOQ, LQC, MQC, HQC e Dil-QC), foram calculados. De posse desses dados, foi possível determinar a precisão intra-dia através do emprego do cálculo do CV:

$$\%CV = [s/M] \times 100 \quad (\text{equação } 4)$$

Onde,

s = desvio padrão da concentração determinada entre as amostras de um mesmo nível de concentração, e

M = média da concentração determinada para as amostras de um mesmo nível de concentração.

Para a determinação da precisão inter-dia (precisão intermediária), as amostras foram preparadas em três dias diferentes como descrito acima, injetadas no equipamento e analisadas separadamente. A partir da curva de calibração, a equação da reta foi gerada para cada dia de análise, e utilizada para calcular as concentrações de cada amostra injetada, e, em seguida, a média obtida para cada nível de QC. Desta forma, no final de 3 dias, foram geradas 3 médias para cada nível de concentração, uma para cada dia de análise (M1, M2, M3). A partir da média obtida em cada dia de análise, foi possível calcular uma nova média (M4) e o desvio padrão entre essas médias (sdM4), para cada nível de concentração. Sendo assim, a precisão inter-dia, ou, precisão intermediária após 3 dias de análise, foi calculada, de acordo com a equação abaixo:

$$\%CV = (sdM4/M4) \times 100 \quad (\text{equação } 5)$$

4.16.7 Exatidão

Para determinação da exatidão dos métodos analíticos empregados para análise da miricitrina em plasma de rato e camundongo, foram utilizadas amostras QC nas mesmas concentrações utilizadas na análise da precisão. As amostras da curva de calibração foram analisadas e a equação da reta gerada, foi utilizada para calcular a concentração de cada amostra QC injetada. A partir da determinação da concentração calculada das amostras, foi possível determinar a média desta concentração para cada nível de concentração. Desta forma, os valores obtidos (calculados) foram comparados com os valores teóricos (nominal), para cada concentração avaliada, de acordo com a *equação 6*:

$$\text{Exatidão} = \frac{[\text{Concentração média calculada (QC)}] \times 100}{\text{Concentração nominal}} \quad (6)$$

Para a determinação da exatidão inter-dia, as amostras foram preparadas em três dias diferentes conforme descrito anteriormente para determinação da precisão inter-dia. Desta forma, a injeção das amostras gerou, para cada dia de análise, uma ‘concentração calculada média’ para cada nível de concentração, e no final de 3 dias, foi possível obter uma nova média. A partir dos dados obtidos após 3 dias de análise, foi possível calcular a exatidão intermediária utilizando a mesma equação descrita acima para determinar a exatidão intra-dia (*equação 6*). Nesse caso, a ‘concentração calculada’ refere-se à média final encontrada após os 3 dias de análise, para cada nível de concentração das amostras QC.

4.16.8 Ensaio de Estabilidade em plasma de rato

A estabilidade do composto miricitrina foi determinada apenas após o processamento das amostras em plasma de rato. Para a determinação da estabilidade da miricitrina, as amostras processadas foram mantidas, por 24 horas, à 4°C no amostrador ou submetidas a 3 ciclos de congela-descongela. Para tanto, as amostras QC (LCQ, MCQ e HCQ) da miricitrina e solução de trabalho do PI foram preparadas, extraídas e analisadas conforme descrito na *seção 4.15*. As amostras foram preparadas em quintuplicata. Após análise dos resultados, as amostras permaneceram no amostrador por 24h, e, após esse período, foram gentilmente agitadas e novamente injetadas no equipamento e

analisadas. A estabilidade da miricitrina, após permanecer 24 horas no amostrador, foi calculada conforme a equação abaixo (*equação 7*):

$$\% \text{ Estabilidade} = \frac{(\text{área da miricitrina}/\text{área do PI após 24h})}{(\text{área da miricitrina}/\text{área do PI injetadas após preparo})} \times 100$$

No caso da análise de estabilidade da miricitrina através do método congela-descongela, as mesmas amostras CQ e PI, acima descritas, foram utilizadas. As amostras foram preparadas (quintuplicata) e analisadas conforme descrito anteriormente. Ao término da injeção das amostras, as mesmas foram acondicionadas em freezer -20°C. Após 24h, as amostras foram descongeladas, agitadas gentilmente e novamente injetadas (1º ciclo congela-descongela). Esse ciclo foi repetido por mais 2 vezes. A análise de estabilidade ao final do terceiro ciclo congela-descongela foi determinado através da equação abaixo (*equação 8*):

$$\% \text{ Estabilidade} = \frac{(\text{área da miricitrina}/\text{área do PI após 3º ciclo})}{(\text{área da miricitrina}/\text{área do PI após preparo da amostra})} \times 100$$

4.17 Estudo do perfil farmacocinético da miricitrina em roedores

4.17.1 Análise da miricitrina em plasma de camundongo

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (n = 5) da linhagem CD1 machos pesando entre 20 – 25 g, conforme descrito no *item 4.1*. Os animais receberam água *ad libitum* e, três horas antes do início da coleta de sangue dos animais, a ração foi retirada. Os animais foram tratados com miricitrina na dose de 3 mg/kg de peso corporal pela via intravenosa e 30 mg/kg de peso corporal pela via oral.

Para administração oral em camundongo, a miricitrina foi primeiramente dissolvida em Tween 80 (concentração final 5%) e posteriormente diluída em solução salina (obtidos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para a administração via intravenosa em camundongos, a miricitrina foi primeiramente dissolvido com dimetilsulfóxido (DMSO) e solução fisiológica (concentração final de DMSO de 2%). No momento da coleta, os animais foram anestesiados

com isoflurano e a coleta de sangue foi realizada através de punção cardíaca. Os tempos de coleta de sangue para ambas as vias de administração, após o tratamento com o flavonoide miricitrina foi: 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 minutos. O sangue coletado foi imediatamente transferido para tubos de plástico contendo anticoagulante heparina (50 UI/mL). As amostras foram centrifugas (13000 rpm, a 4°C, durante 15 minutos) e o sobrenadante (plasma) coletado e armazenado em freezer à -80°C. As amostras de plasma foram extraídas e analisadas conforme descrito nos *itens 4.15.3 e 4.15.2*, respectivamente.

4.17.2 Análise da miricitrina em plasma de rato

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos (n = 5) da linhagem Sprague Dawley, machos pesando entre 300 – 350 g, conforme descrito no *item 4.1*. Os animais foram tratados com miricitrina na dose de 2 mg/kg de peso corporal pela via intravenosa e 40 mg/kg pela via oral.

Para administração oral e intravenosa em ratos, a miricitrina foi dissolvida com uma mistura de etanol:polietilenoglicol:tween 80:solução salina (1:2:1:6). Os animais receberam água *ad libitum* e, três horas antes do início da coleta de sangue dos animais, a ração foi retirada. Os animais que receberam o composto pela via intravenosa possuíam uma cânula inserida na veia jugular e externalizada nas costas, por onde foi realizada a administração da miricitrina. No momento da coleta, os animais, tratados com miricitrina pela via oral ou intravenosa, foram anestesiados com isoflurano e a coleta de sangue, foi realizada pelo método de punção da veia sublingual, após 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480 e 720 e minutos, da administração do composto. O sangue foi coletado dentro de tubos de vidro contendo anticoagulante heparina (concentração 50 UI) e, em seguida, foram centrifugadas (4000 rpm, a 4°C, durante 15 minutos) e o sobrenadante (plasma) coletado e armazenado em freezer à -80°C. O volume de sangue retirado era repostado com solução salina. As amostras de plasma foram extraídas e analisadas conforme descrito nos *itens 4.15.3 e 4.15.2*, respectivamente.

As curvas de calibração, em plasma de rato e camundongo foram preparadas (em duplicata), e analisadas conforme os métodos analíticos validados e descritos neste trabalho (*seção 4.15 e 4.16*), e injetadas juntamente com as amostras coletadas dos animais após o processamento das mesmas. A partir da curva de calibração, foi possível

calcular a concentração de miricitrina presente nas amostras de plasma de rato e camundongo, coletadas após administração intravenosa e oral deste composto.

4.18 Estudo preliminar do processo de metabolização da miricitrina em camundongos

4.18.1 Coleta do material em camundongos

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos da linhagem CD1 machos pesando entre 20 – 25 g, provenientes do Biotério Setorial do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia da UFSC (Florianópolis, SC), os quais foram mantidos sob as mesmas condições descritas no *item 4.1*. (CEUA, processo número PP00496). Os animais (n=6) foram tratados com miricitrina na dose 10 mg/kg de peso corporal pela via oral, durante 7 dias, 1 vez ao dia, conforme protocolo descrito para análise do efeito anti-inflamatório da miricitrina no modelo de colite experimental (*seção 4.3*), entretanto, nesse caso, os animais foram apenas tratados com miricitrina, sem indução da colite experimental. No sétimo dia, decorridos 60 e 90 minutos da administração, os animais foram anestesiados com isoflurano, o sangue foi coletado por punção cardíaca e, após sacrifício, a porção final do cólon foi coletada e limpa em solução salina. Após coleta dos cólons, os mesmos foram pesados e 1 mg de cólon foi homogeneizado com 1 ml de tampão fosfato. O homogeneizado de cólon e o plasma separado foram armazenados em freezer à -80°C para análises posteriores.

4.18.2 Identificação da miricitrina e seus possíveis metabólitos em plasma e no cólon de camundongo pela técnica de LC-MS/MS (Q-Tof)

Esse experimento foi realizado no laboratório experimental da Waters Corporation (São Paulo, SP) pelo Doutor Amadeu Hoshi Iglesias. A técnica de extração utilizada para extrair a miricitrina do plasma e do cólon de camundongos foi realizada conforme descrito na *seção 4.15.3*. As amostras foram analisadas em sistema de UPLC (do inglês, *Ultra Performance Liquid Chromatography*) acoplado a Espectrômetro de Massas Tandem com analisador de massas do tipo quadrupolo-tempo de voo (do inglês, *quadrupole time of flight*, QTOF),

(Acquity UPLC – Xevo G2 Q-Tof, Waters, EUA), equipado com uma fonte ionizadora do tipo eletrosspray, o qual foi operado no modo íon negativo. As condições de análise foram otimizadas, sendo a voltagem do capilar ajustada para 2.0 kV e a Voltagem do Cone de 35 V. O modo de aquisição utilizado foi o MS^E, o qual permite uma informação de massa exata tanto dos íons intactos quanto dos fragmentos que são obtidos. A coluna cromatográfica utilizada foi uma C18Acquity BEH (2.1x50 mm, 1.7 µm, Waters corporation, Dartford, UK), condicionada em forno na temperatura de 40°C. A fase móvel utilizada foi a mistura de 0.1% ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0.1% ácido fórmico e, a eluição foi realizada através de um método gradiente: 0 min – 5% de B; 0 – 1 min 50% de B; 1 – 3,5 min 95% de B; 3,5 – 4,5 min 95% de B; 4,5 - 4,51 min– 5% B. O fluxo de injeção foi de 0,450 mL/min e o volume de amostra injetada foi de 5 µL. A aquisição dos dados foi feita pelo Software MassLynx[®] (Waters Corporation) e os possíveis metabólitos analisados com auxílio do software MetaboLynx[®] (Waters Corporation). O software MarkerLynx foi utilizado para identificar, através de análises estatísticas diferentes, as diferenças entre uma amostra e outra.

4.19 Estudo da correlação *in vivo* entre a atividade antinociceptiva da miricitrina e sua concentração plasmática.

4.19.1 Avaliação da atividade antinociceptiva

O efeito antinociceptivo da miricitrina foi avaliado no modelo de dor causado pela injeção de PMA (do inglês, *Phorbol Myristate Acetate*), na pata traseira direita dos camundongos. Imediatamente após a injeção de PMA, os animais foram colocados isoladamente em caixas de acrílico cujo piso é composto por uma grade metálica. A alodínia mecânica foi avaliada através do uso de um filamento de von Frey (0,6g), o qual foi pressionado na pata traseira de cada animal. Foram realizadas 10 estimulações na pata traseira de cada animal e o resultado foi expresso na forma de % de retirada da pata. Após 2 horas da administração de PMA, dois grupos de animais foram tratados separadamente com miricitrina pela via oral e intravenosa, nas doses de 30 e 3 mg/kg, respectivamente. Decorridos 5, 15, 30, 60, 120, 240 e 480 horas da administração da miricitrina, os animais foram submetidos ao teste de alodínia mecânica. Este procedimento também foi realizado antes da injeção de PMA e do tratamento com miricitrina, a fim de obter

a resposta basal de cada animal utilizado no experimento. Os animais que apresentaram um alto índice de resposta (>3 retiradas para cada ensaio de dez toques) foram excluídos do experimento.

4.19.2 Estudo farmacocinético da miricitrina em camundongos

Para o estudo da correlação entre a atividade farmacológica e a concentração plasmática da miricitrina, foram utilizados os dados do perfil farmacocinético da miricitrina em camundongos, após administração oral e intravenosa, os quais foram determinados conforme descrito no item 4.17.1.

4.20 Determinação do coeficiente de partição da miricitrina em octanol/água

A determinação do coeficiente de partição do flavonoide miricitrina em octanol/água foi realizada segundo metodologia descrita por Xavier e colaboradores (2006). Em tubos de ensaio foram adicionados 2,0 mL de uma solução de miricitrina na concentração de 50 µM e 2,0 mL de octanol previamente saturado com água. A mistura foi agitada durante 1 minuto e em seguida centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Após centrifugação, a concentração de miricitrina foi determinada em cada uma das fases por HPLC-MS conforme método descrito no *item 3.4*. Para calcular a concentração dos compostos em cada uma das fases, aquosa ou oleosa, foi construída uma curva padrão em solvente. O coeficiente de partição octanol/solução aquosa foi determinado pela equação:

$$K = \frac{C_o}{C_a \cdot r} \quad (\text{equação 9})$$

onde:

C_o = concentração de miricitrina no Octanol

C_a = concentração de miricitrina na solução aquosa

r = razão dos volumes entre a fase oleosa e a aquosa

4.21 Drogas e reagentes

A miricitrina foi isolada pelo grupo do professor Moacir Geraldo Pizzolatti, no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, a partir das folhas da planta do gênero *Eugenia*, mais especificamente, da planta popularmente conhecida no Brasil como pitangueira (*E. uniflora*). A miricetina, forma aglicona, foi obtida através da hidrólise química da miricitrina com ácido clorídrico (HCl) a 10% em Etanol/Água (1:1) e purificada por cromatografia em coluna (Franco *et al.*, 2010). Os compostos isolados foram identificados por espectrometria de ressonância nuclear (¹H e ¹³C) e, por meio de comparação com espectro anteriormente publicado para estes compostos (Agrawal, 1989). Os flavonoides isolados apresentaram grau de pureza superior a 98%.

O DSS (P.M. 36.000–50.000) foi adquirido da MP Biomedicals (Solon, OH, EUA). O anticorpo monoclonal anti-fosfo-p65 e os anticorpos policlonais anti-fosfo-ERK, e anti-fosfo-COX2, para camundongo foram obtidos da Cell Signaling Technology, Inc., (Beverly, MA, EUA), e o anticorpo monoclonal anti-fosfo-JNK, e os anticorpos policlonais anti-fosfo-p38 e anti-nPKCε (1:100), foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EUA. O anticorpo secundário Ab EnVision Plus, estreptavidina–HRP, e 3,3'-diaminobenzidina foram adquiridos da DakoCytomation (Carpinteria, CA, EUA). O peróxido de hidrogênio (H₂O₂), Tween 20, Tween 80, EDTA, aprotinina, PBS, H&E, tetrametilbenzidina (TMB), fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e lipopolissacarídeo (Wu *et al.*) (sorotipo 0111:B4) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Os Kits para a dosagem de CXCL1/KC, IL-6 e TNF-α foram provenientes da R&D systems (Minneapolis, EUA). O Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), o Azul de Trypan, o soro fetal bovino, água ultrapura, a penicilina e a estreptomina foram adquiridas da GIBCO BRL Life technologies (Gaithersburg, MD, EUA). A enzima transcriptase reversa, Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV), o oligo dT 15, os deoxinucleotídeos (dNTPs), o tampão de primeira fita para a reação de transcrição reversa, o inibidor de RNase (RNasin) e o dietiltreitól (DTT), foram procedentes da Invitrogen (São Paulo, Brasil).

O kit Master Mix TaqMan[®] Universal PCR, a placa de reação óptica de 96 poços, os primers específicos para camundongos, com marcação 3'quencher MGB e FAM, para os COX-2(Mm01307334_g1), NOS2(Mm01309898_m1), TNF-α (Mm00443258_m1), IL-6

(Mm99999064_m1), GAPDH (do inglês, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (NM_008084.2) foram todos procedentes da Applied Biosystems (São Paulo, SP, Brasil).

O DAB, o entellan[®], o formaldeído e a hematoxicilina de Harris foram adquiridos da Merck, (Darmstadt, Alemanha). O reagente de Bradford é proveniente da Bio-Lab Laboratories (Richmond, VA, EUA).

As amostras padrão de epicatequina (pureza $\geq 98\%$) e de quercetina (pureza $\geq 95\%$), as quais foram utilizadas como padrão interno (PI), foram adquiridas da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os solventes metanol, acetonitrila e acetona, grau HPLC, foram obtidos da empresa J. T. Baker (Xalostoc, Mexico). O ácido fórmico e o ácido acético foram obtidos das empresas Aldrich Chemical Company (Milwaukee, USA) e Nuclear (Diadema, SP, Brasil), respectivamente. A heparina sódica (5000UI) foi obtida a partir da indústria farmacêutica Cristália (São Paulo, Brasil). A água destilada foi previamente purificada utilizando um sistema Milli-Q, fornecido pela Millipore Corporation.

4.22 Análise estatística

Para análise dos resultados obtidos a partir do estudo da atividade anti-inflamatória da miricitrina no modelo de colite experimental, o teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, foi utilizado para os dados não paramétricos. Para a análise dos dados paramétricos, as diferenças estatísticas entre mais de 2 grupos, foi utilizada ANOVA de uma via seguida do teste Student Newman-Keuls. As análises estatísticas foram realizadas usando-se o software Graphpad Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Todos os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média.

Os parâmetros determinados na etapa de validação foram expressos como: média (M), desvio padrão da média (Sd) e coeficiente de variação (CV).

Para análise do perfil farmacocinético da miricitrina, a curva da concentração plasmática média da miricitrina *versus* tempo de coleta, obtida após administração intravenosa ou oral do composto aos animais, foi gerada a partir do software Graphpad Prism (version 4.0, San Diego, CA, USA). Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados utilizando o método monocompartimental e bicompartimental, e cinética de primeira ordem, com auxílio do programa WinNonlin[®], versão 5.3 (Pharsight Corp., St. Louis, MO, EUA).

Farmacocinética não-compartimental: Os parâmetros determinados foram, concentração no tempo 0 (C_0), constante da taxa de eliminação terminal (K_e), tempo de meia via de eliminação ($t_{1/2}$), área sob a curva (AUC), volume de distribuição na fase terminal (V_z) e clearance (CL). A AUC $_{0-\infty}$ foi calculada utilizando o método trapezoidal linear/log a partir do tempo zero até o último tempo de coleta após administração i.v. A fase terminal para calcular k_e foi especificado numa faixa de 0.5-1h (para camundongo) e 0,5-12h (para rato) após administração, e, o k_e foi calculado pela regressão linear da fase linear log terminal.

Farmacocinética compartimental: Os parâmetros farmacocinéticos foram calculados usando o modelo de dois compartimentos com método de minimização Gauss-Newton e fator ponderador, como $1/\hat{Y}$, $1/Y * Y$, $1/Y$ e Uniform. O fator ponderador de escolha deve ser aquele que apresentar menor valor para a soma ponderada do quadrado dos resíduos (do inglês, Weighted Sum of Squared Residuals, WSSR). A equação para o modelo bicompartimental é: $C=A * e^{-\alpha t} + B * e^{-\beta t}$, onde C é a concentração da droga no plasma no tempo t; A e B são coeficientes matemáticos; α é a constante de distribuição; β é a constante da taxa de fase terminal; t é o tempo.

Os dados farmacocinéticos são apresentados como a média \pm erro padrão, que foram calculados a partir do software winNonlin.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da ação do flavonoide miricitrina sobre a gravidade da colite experimental induzida por DSS em camundongos

A fim de determinar a menor dose eficaz no modelo experimental de colite induzida pelo DSS em camundongo, realizamos, primeiramente, um estudo de dose-resposta. Conforme descrito anteriormente, o DSS na concentração de 3% foi oferecido na água de beber dos animais do grupo controle positivo (grupo veículo + DSS) e do grupo tratado (grupo Miricitrina + DSS) durante cinco dias consecutivos. No quinto dia, o DSS foi retirado e os animais receberam apenas água filtrada por mais 2 dias seguidos. O grupo veículo recebeu água filtrada durante os 7 dias de experimento. O tratamento com miricitrina, nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, foi inicialmente administrado aos animais pela via oral, 1 hora antes do início da indução com DSS 3%, e seguiu durante todo protocolo experimental, sendo administrado uma vez ao dia.

Durante todo protocolo experimental, os animais foram monitorados e avaliados quanto à alteração do peso corporal, presença de sangue nas fezes e diarreia, cujos parâmetros permitiram calcular o índice de atividade da doença (IAD) através de um somatório de escores. Como pode ser observado na Figura 5 A, a administração de DSS 3% durante cinco dias, causou a perda de peso corporal de forma gradativa, sendo apresentada de forma mais acentuada e significativa, a partir do quinto dia. Entretanto, o tratamento oral com miricitrina, na dose de 10 mg/kg, preveniu de forma marcante a perda de peso corporal dos animais, a partir do quinto dia, enquanto que as demais doses, 1 e 3 mg/kg de miricitrina, inibiram a perda de peso dos animais a partir do sexto dia de indução com DSS 3%. A avaliação do IAD (Figura 5 B e C) nos permitiu observar que os animais que receberam apenas DSS 3% durante cinco dias consecutivos apresentaram aumento no IAD, que foi prevenido nos animais tratados com miricitrina de forma dose-dependente, sendo melhor visualizado no gráfico da área sobre a curva (ASC) do IAD (Figura 5 C). Conforme mostrado na figura 5 B, o tratamento oral com miricitrina permitiu redução do IAD já a partir do terceiro dia, entretanto, foi mais evidente a partir do quarto dia do protocolo experimental.

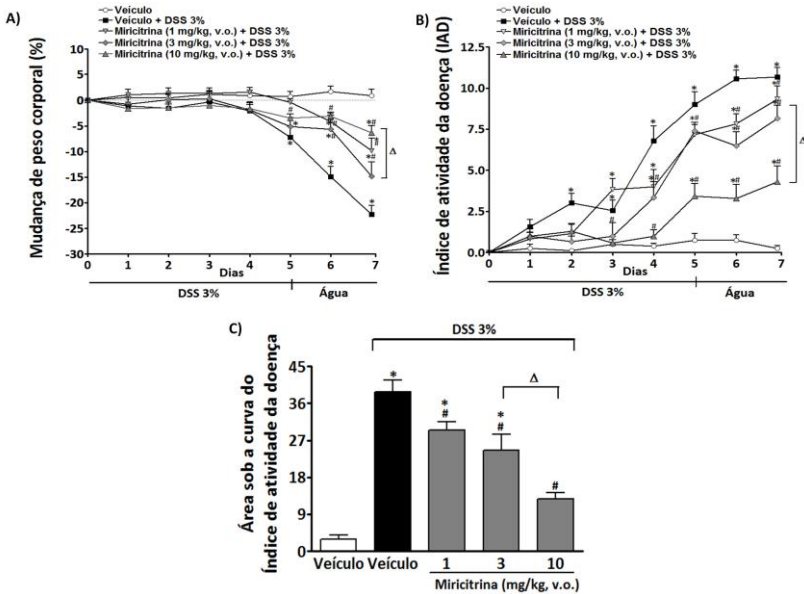


Figura 5. Efeito do flavonoide miricitrina sobre os parâmetros macroscópicos na colite experimental induzida pelo DSS em camundongos. Os animais receberam solução de DSS 3% na água de beber durante 5 dias, seguidos por 2 dias de água filtrada (grupo veículo + DSS3% e grupo Miricitrina + DSS3%), ou, apenas água durante 7 dias (grupo veículo ou controle). O tratamento oral com miricitrina (1, 3 e 10 mg/kg) iniciou-se 1h antes da indução com DSS e seguiu durante os 7 dias de experimento, sendo administrado uma vez ao dia. (A) O tratamento oral com miricitrina preveniu a perda de peso corporal dos animais com colite experimental em todas as doses avaliadas, bem como também reduziu de forma dependente da dose o índice de atividade da doença (IAD). (B) Este resultado pode ser melhor evidenciado no gráfico da área sob a curva do IAD apresentado no gráfico (C). * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. Δ $p < 0,05$ comparação entre os grupos experimentais. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Além dos parâmetros acima descritos, as alterações colônicas macroscópicas, a saber: hiperemia, pontos de ulceração e espessamento do epitélio intestinal, também foram avaliados no cólon dos animais ao final do protocolo experimental. A partir da análise e do somatório de escores dos parâmetros macroscópicos supracitados, foi possível determinar o dano macroscópico no cólon dos animais após indução com DSS 3%. Conforme mostrado na figura 6, a administração com DSS 3% gerou um processo inflamatório que está diretamente associado

a um aumento da hiperemia, edema e ulceração do tecido colônico. Interessantemente, esses parâmetros foram significativamente reduzidos pelo tratamento com miricitrina nas doses de 3 e 10 mg/kg de peso corporal, resultando em um menor dano ao cólon destes animais.

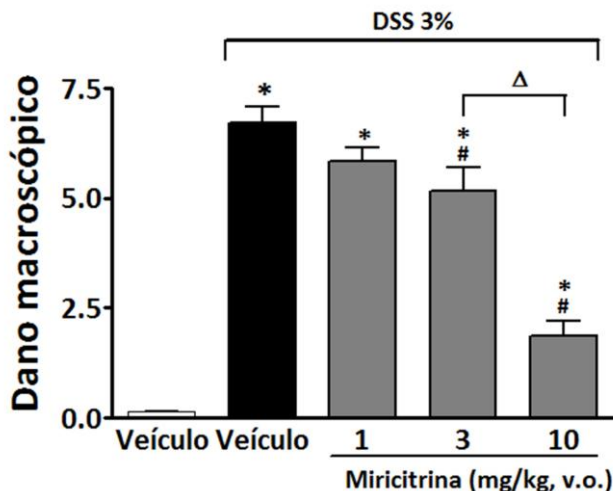


Figura 6. Efeito do flavonoide miricitrina sobre o dano macroscópico na colite experimental induzida pelo DSS em camundongos. A colite experimental foi induzida pela administração de DSS 3% na água de beber durante 5 dias, seguidos por 2 dias de água filtrada (grupo veículo + DSS3% e grupo Miricitrina + DSS3%). O grupo veículo (controle negativo) recebeu veículo por via oral e água durante os sete dias. Os animais foram tratados com miricitrina (1, 3 e 10 mg/kg, v.o.), uma vez ao dia, do dia 0 ao dia 7. O tratamento oral com miricitrina nas doses de 3 e 10 mg/kg, preveniu o dano tecidual macroscópico do cólon dos camundongos com colite experimental. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. $\Delta p < 0,05$ comparação entre os grupos experimentais. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Outra característica marcante do modelo de colite induzido pelo DSS é o encurtamento do intestino grosso (Bento *et al.*, 2011a). De fato, foi observado que o pré-tratamento com miricitrina foi capaz de proteger, de forma dependente da dose, o encurtamento do cólon dos animais com colite experimental (Figura 7 A e B).

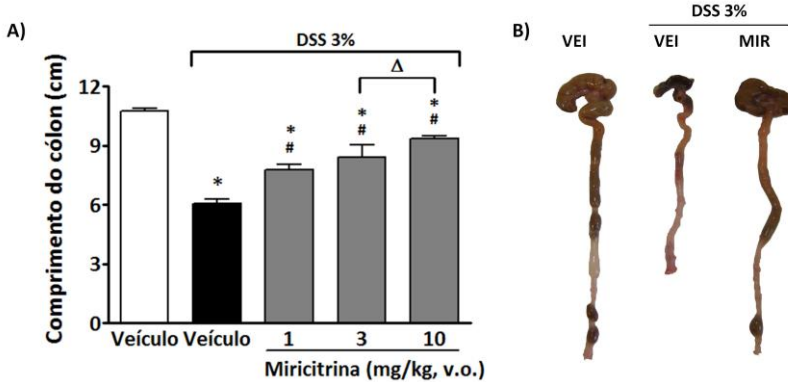


Figura 7. Efeito do flavonoide miricitrina sobre o tamanho do cólon dos animais com colite experimental induzida pelo DSS. Os animais receberam solução de DSS 3% na água de beber durante 5 dias, seguidos por 2 dias de água filtrada. O animais foram tratados com miricitrina (1, 3 e 10 mg/kg, v.o.) durante os sete dias do protocolo experimental. (A) O tratamento oral com miricitrina nas doses de 3 e 10 mg/kg, preveniu o encurtamento do cólon dos camundongos com colite experimental de maneira dose-dependente. (B) Ilustração do cólon dos animais ao final do protocolo experimental. O tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg) preveniu o encurtamento do cólon, o dano macroscópico associado a hiperemia e espessamento da mucosa e a formação de fezes líquidas no cólon dos animais com colite experimental. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. $\Delta p < 0,05$ comparação entre os grupos experimentais. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Levando em consideração os resultados obtidos no estudo com o emprego de diferentes doses do flavonoide miricitrina no modelo de colite induzido por DSS 3%, podemos inferir que o pré-tratamento com a miricitrina na dose de 10 mg/kg pela via oral (v.o.) apresentou eficácia superior em relação as doses de 1 e 3 mg/kg administradas pela mesma via, e, portanto, foi a dose escolhida para a realização dos demais experimentos.

5.2 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre o dano microscópico do tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos

A integridade da mucosa epitelial, bem como, o controle da infiltração de polimorfonucleares no tecido inflamado representam importantes fatores para manutenção da homeostase intestinal. Estudos prévios em modelo de colite experimental mostraram que o dano do tecido epitelial intestinal está diretamente associado a um aumento na infiltração de células inflamatórias, como por exemplo, neutrófilos, na mucosa intestinal, o que caracteriza o início e posterior amplificação do

processo inflamatório (Bento *et al.*, 2011a). A fim de avaliar o efeito do tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg) sobre o dano microscópico no cólon dos animais com colite experimental, foi realizada a análise dos cortes histológicos do tecido colônico desses animais. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com DSS 3% induziu ampla destruição da arquitetura do cólon e das criptas intestinais, reduziu o número de células caliciformes, aumentou o espessamento da submucosa, além de apresentar grande quantidade de infiltrado celular na mucosa intestinal. Por outro lado, o tratamento oral com a miricitrina (10 mg/kg) reduziu drasticamente o dano epitelial causado pelo DSS, uma vez que preveniu a destruição da estrutura epitelial e das criptas intestinais, além de diminuir significativamente a infiltração celular na mucosa intestinal (figura 8 A). A figura 8 B apresenta o escore microscópico obtido a partir da análise microscópica do cólon, e, corroborando com a análise histológica do cólon dos animais, apresentada na figura 8 A, o tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg), foi capaz de reduzir significativamente o dano tecidual microscópico quando comparado com o grupo veículo + DSS 3%.

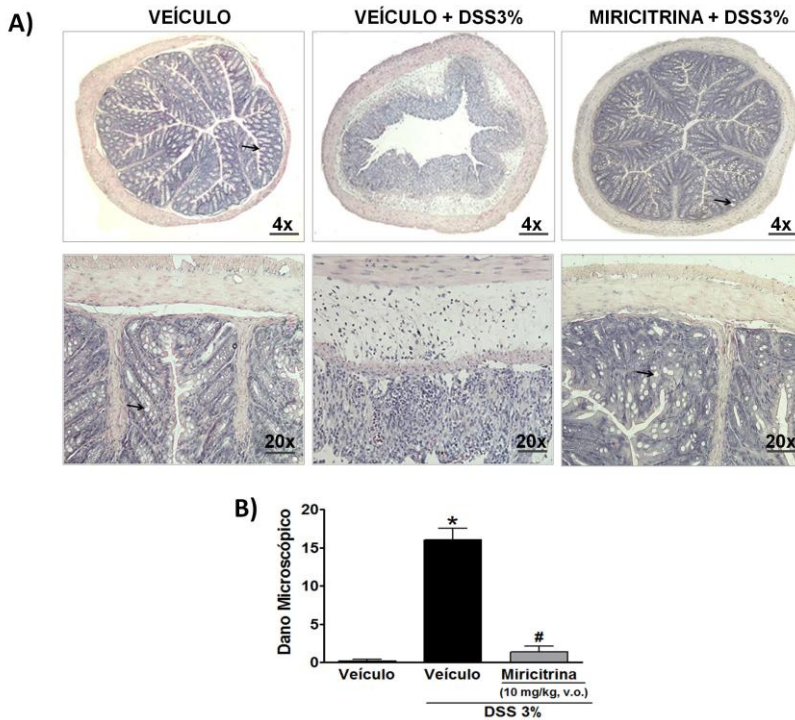


Figura 8. Efeito do flavonoide miricitrina sobre o dano microscópico do tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos. Ao final do sétimo dia da colite induzida pelo DSS os cólons foram coletados e corados com H&E. **(A)** Imagens representativas de cortes histológicos do cólon dos animais controle (Veículo), Veículo + DSS3% e Miricitrina (10mg/kg, v.o.) + DSS 3% corados com H&E. **(B)** O tratamento oral com miricitrina reduziu de forma significativa o dano tecidual microscópico. As colunas representam a média em uma escala de escore do dano microscópico dos cólons de 4-6 animais, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. (Kruskal-Wallis seguido de teste *post hoc* de Dunn). As setas (▶) indicam as células caliciformes presentes no tecido colônico. Cortes histológicos corados com H&E em aumento de 40 e 200 X.

5.3 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis de citocinas no tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos

Já está bem estabelecido na literatura que citocinas e quimiocinas (como por exemplo, a TNF- α , IL-6 e CXCL-1/KC) estão criticamente envolvidas com o agravamento da colite, bem como, com o recrutamento de células inflamatórias para o local da inflamação (Barker *et al.*, 1991; Bento *et al.*, 2008). A fim de avaliar se o tratamento oral com miricitrina poderia inibir os níveis e a expressão de citocinas/quimiocinas no tecido colônico dos animais com colite experimental, os animais foram sacrificados ao final do protocolo experimental os cólons foram removidos e processados para a avaliação dos níveis teciduais de citocinas inflamatórias. Como mostrado na figura 9 A, os níveis teciduais colônicos da citocina pró-inflamatória IL-6 foram significativamente aumentados nos animais que receberam DSS 3% durante cinco dias quando comparados com o grupo controle, que recebeu apenas água. Entretanto, o tratamento com miricitrina (10 mg/kg), reduziu de forma significativa os níveis teciduais de IL-6 quando comparado com o grupo veículo + DSS 3%. Além disso, os níveis teciduais da quimiocina CXCL1/KC também foram avaliados no cólon dos animais e, conforme podemos observar na figura 9 B, os níveis teciduais de quimiocina CXCL1/KC estavam aumentados no grupo veículo + DSS 3% porém, apresentaram-se notavelmente reduzidos no grupo tratado com miricitrina (10 mg/kg).

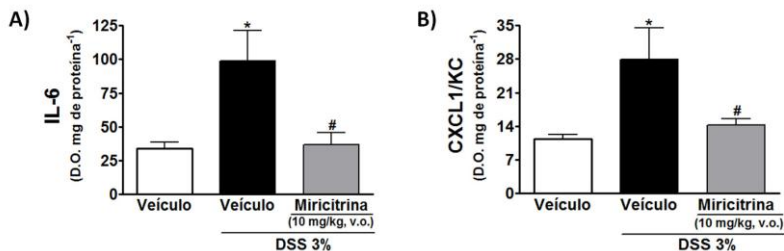


Figura 9. Efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis de citocinas no tecido colônico na colite experimental induzida por DSS em camundongos. Ao final do protocolo experimental induzido pelo DSS, o cólon dos animais foi coletado para dosagem do nível de citocinas no tecido colônico através da técnica de ELISA. **(A)** O tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg), reduziu significativamente os níveis teciduais de IL-6 no cólon dos animais com colite experimental, quando comparado com o grupo veículo + DSS3%. **(B)** Da mesma forma, o nível tecidual da quimiocina CXCL1/KC foi reduzida no cólon dos animais tratados com miricitrina (10 mg/kg), quando comparado com o grupo veículo + DSS 3%. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. D.O., densidade óptica. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

5.4 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão de citocinas pró-inflamatórias na colite experimental induzida por DSS em camundongos

Para a quantificação do RNAm das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α , amostras do tecido do cólon dos animais foram coletadas e submetidas à extração do RNA total e reação de PCR em tempo real. Conforme pode ser observado na figura 10 A e B, a expressão do RNAm para as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , respectivamente, estavam significativamente aumentadas quando comparadas com o grupo que recebeu apenas água durante todo o experimento. No entanto, o tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg) foi capaz de reduzir a expressão do RNAm para ambas citocinas pró-inflamatórias.

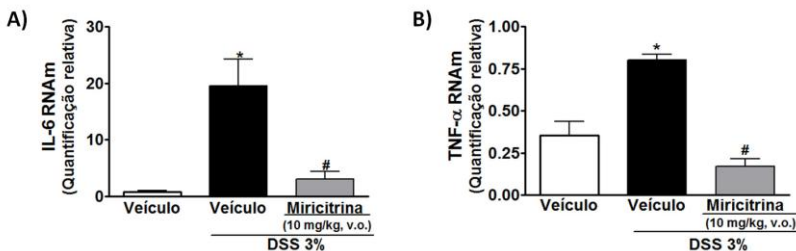


Figura 10. Efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão do RNAm para as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , na colite experimental induzida por DSS em camundongos. Ao final do sétimo dia da colite induzida pelo DSS os cólons foram coletados para avaliação da expressão do RNAm de mediadores inflamatórios através da técnica da PCR em tempo real. O tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg), reduziu significativamente a expressão do RNAm para a IL-6 (A) e do RNAm para o TNF- α (B) no cólon dos animais com colite experimental, quando comparado com o grupo veículo + DSS3%. Os resultados representam a média Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

Levando em consideração os resultados apresentados na figura 9 e 10, podemos sugerir que o efeito antiinflamatório da miricitrina esteja ocorrendo devido a regulação sobre a produção e expressão dessas citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias.

5.5 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão e produção de enzimas inflamatórias na colite experimental induzida por DSS em camundongos

Além das citocinas e quimiocinas, as enzimas, COX-2 e NOS2, também são induzidas diante de um processo inflamatório, as quais exercem papel importante na modulação da inflamação (Moncada *et al.*, 1991; Oh *et al.*, 2007). Conforme mostrado na figura 11 A e B, a administração de DSS 3% provocou aumento significativo na expressão do RNAm para a COX-2 e NOS2 quando comparado com o grupo controle. Entretanto, a administração oral de miricitrina (10 mg/kg), reduziu significativamente a expressão do RNAm para essas enzimas. Além disso, os níveis teciduais da enzima COX-2 também foram avaliados através da técnica da imunohistoquímica, e conforme pode ser observado na figura 11 C, ocorreu aumento acentuado para a marcação da enzima COX-2 no tecido colônico dos animais que receberam apenas DSS 3%, quando comparado aos resultados do grupo veículo. Por outro

lado, o tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg) reduziu significativamente a marcação para a enzima COX-2 no cólon dos animais, quando comparado com o grupo veículo + DSS3%. A quantificação (densidade óptica) dos níveis colônicos da enzima COX-2 está representado na figura 11 D, na qual é mostrado aumento significativo na imunomarcação para enzima COX-2 no grupo veículo + DSS3%, e redução significativa nos cólons de animais tratados com miricitrina (10 mg/kg). Levando em consideração os resultados obtidos, o efeito anti-inflamatório da miricitrina parece também estar associado à redução na expressão de NOS2, bem como, na redução da expressão e produção da COX-2.

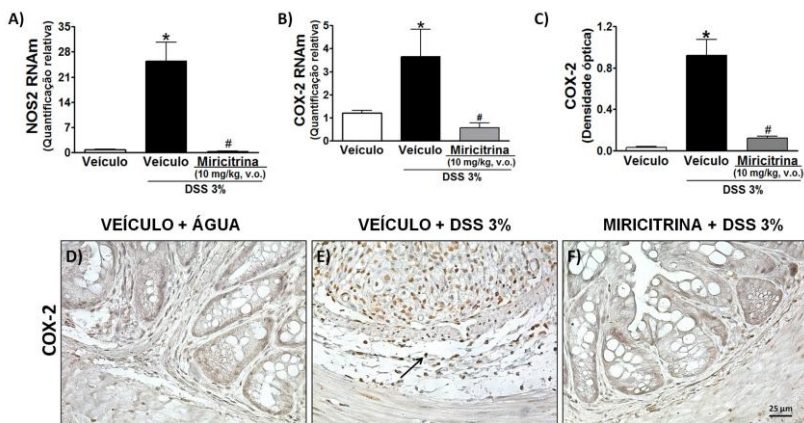


Figura 11. Efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis da proteína e do RNAm para as enzimas pró-inflamatórias, COX-2 e NOS2, na colite experimental induzida por DSS em camundongos. Ao final do sétimo dia da colite induzida pelo DSS os cólons foram coletados para avaliação da expressão de NOS2 e COX-2. O tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg), reduziu significativamente a expressão do RNAm para a NOS2 (A), bem como também foi efetivo em diminuir a expressão do RNAm (B) e da proteína (C-F) COX-2 no cólon dos animais com colite experimental, quando comparado com o grupo veículo + DSS3%. Ilustração das marcações para COX-2 através da técnica de imunohistoquímica nos grupos veículo + água (D), veículo + DSS 3% (E) e miricitrina + DSS 3% (F). (C) Representação gráfica para a imunomarcação da COX-2 no tecido colônico. A escala da barra corresponde a 25 µm e aplica-se a todos os cortes histológicos. As setas indicam a imunomarcação positiva. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

5.6 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a expressão da PKC ϵ na colite experimental induzida por DSS em camundongos

É atualmente conhecido que a via da PKC ϵ exerce papel crucial na modulação de um processo inflamatório. Além disso, estudos descreveram que a ação antinociceptiva da miricitrina ocorre através da inibição da via de sinalização da PKC ϵ (Meotti *et al.*, 2006b). Dessa forma, foi verificado pela técnica da imunohistoquímica, se os níveis teciduais de PKC ϵ estavam alterados na colite experimental induzida com DSS3%. Conforme apresentado na figura 12 A foi observado aumento na imunomarcagem para a PKC ϵ no cólon dos animais que receberam DSS 3%. De forma interessante, o tratamento oral com o flavonoide miricitrina (10 mg/kg) preveniu de forma significativa o aumento da imunomarcagem para a PKC ϵ no colón dos animais com colite experimental. A quantificação (densidade óptica) dos níveis colônicos da PKC ϵ está representado na figura 12 B, na qual pode ser observado aumento significativo na marcação para a PKC ϵ no grupo veículo + DSS3%, e redução significativa da no cólon dos animais tratados com miricitrina (10 mg/kg).

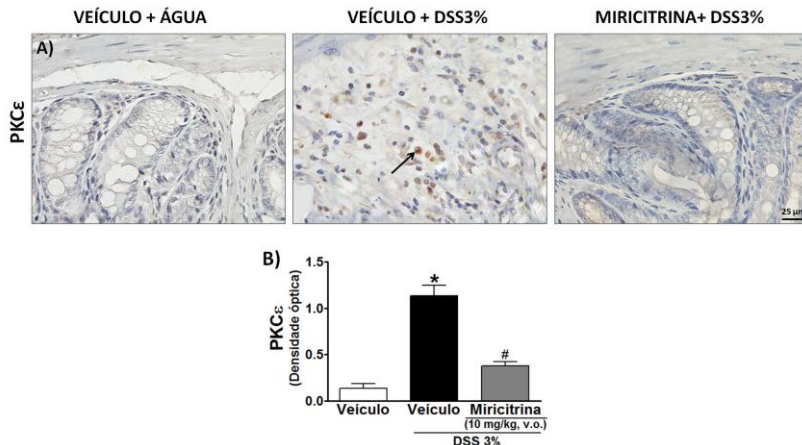


Figura 12. Efeito do flavonoide miricitrina sobre os níveis de PKCε no cólon dos animais com colite experimental induzida por DSS. Ao final do sétimo dia da colite induzida pelo DSS os cólons foram coletados para a quantificação dos níveis de PKCε no tecido colônico através da técnica de imunohistoquímica. (A) Representação da imunomarcção para a PKCε no corte histológico do cólon dos diferentes grupos experimentais: veículo, veículo + DSS3% e miricitrina 10 mg/kg + DSS 3%. A escala da barra corresponde a 25 μm e aplica-se a todos os cortes histológicos. As setas indicam a imunomarcção positiva. (B) Quantificação da imunomarcção apresentado no painel A, representado pela média da densidade óptica obtida dos diferentes grupos experimentais. Os níveis de PKCε no tecido colônico dos animais com colite experimental e tratados com miricitrina (10 mg/kg) foram significativamente reduzidos quando comparados com o grupo veículo + DSS 3%. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

5.7 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a ativação das MAPKs na colite experimental induzida por DSS em camundongos

A cascata de sinalização das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) exerce papel fundamental no processo inflamatório e tem sido relacionada a inúmeras imunopatologias, como no caso das IBDs (Broom *et al.*, 2009). Por esta razão, a expressão da forma fosforilada (Hursel e Westerterp-Plantenga) das diferentes MAPKs: ERK (p-ERK), p38 (p-p38) e JNK (p-JNK), foi avaliada pelo método da imunohistoquímica nos diferentes grupos experimentais. Conforme apresentado na figura 13 A-E foi verificado que a ativação das MAPKs p-p38, p-JNK e p-ERK, foi significativamente aumentada no tecido colônico dos animais do grupo veículo + DSS 3%. Interessantemente, o

tratamento com miricitrina (10 mg/kg), inibiu de forma acentuada a fosforilação dessas MAPKs no tecido colônico dos animais com colite experimental. Em concordância com esses dados, a quantificação (densidade óptica) apresentou aumento significativo na expressão da p-p38, p-JNK e p-ERK no grupo veículo + DSS3%, aumento este que foi reduzido de forma significativa no cólon dos animais tratados com miricitrina (10 mg/kg).

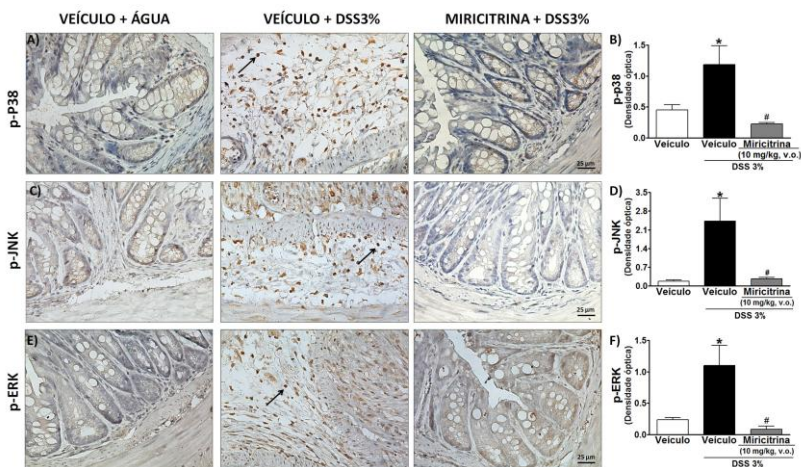


Figura 13. Efeito do flavonoide miricitrina sobre a ativação das MAPKs no cólon dos animais com colite experimental induzida por DSS. Ao final do sétimo dia da colite induzida pelo DSS os cólons foram coletados para avaliação da forma fosforilada das MAPK p38 (A-B), JNK (C-D) e ERK (E-F) através da técnica de imunohistoquímica. (A, C e E) Representação da imunomarcagem para a forma fosforilada da p-38, JNK e ERK, respectivamente, no corte histológico do cólon dos diferentes grupos experimentais: veículo, veículo + DSS3% e miricitrina 10 mg/kg + DSS 3%. A escala da barra corresponde a 25 μ m e aplica-se a todos os cortes histológicos. As setas indicam a imunomarcagem positiva. (B, D e F) Quantificação da imunomarcagem apresentado no painel A, C e E, respectivamente, representado pela média da densidade óptica obtida dos diferentes grupos experimentais. O tratamento com miricitrina reduziu de forma significativa a ativação de p-p38, p-JNK e p-ERK no tecido colônico dos camundongos com colite experimental, quando comparados com o grupo veículo + DSS 3%. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

5.8 Avaliação do efeito do flavonoide miricitrina sobre a ativação do NF- κ B na colite experimental induzida por DSS em camundongos

Inúmeros estudos mostram que o fator de transcrição NF- κ B é responsável pela regulação da expressão de diversos mediadores inflamatórios, os quais estão diretamente envolvidos com o desenvolvimento de doenças inflamatórias crônicas, como as IBDs (Ellis *et al.*, 1998; Tak e Firestein, 2001; Spehlmann e Eckmann, 2009). Sendo assim, foi avaliado através da técnica da imunohistoquímica, o efeito da miricitrina sobre a expressão da subunidade fosforilada p65 do NF- κ B (p-p65 NF- κ B) no tecido do cólon dos animais com colite induzida pelo DSS. Os resultados demonstraram pronunciada ativação da subunidade fosforilada p65 do NF- κ B no cólon dos animais que receberam apenas DSS 3%, quando comparado com o grupo veículo (controle negativo) (figura 14 A). Por outro lado, o tratamento oral com miricitrina (10 mg/kg), reduziu significativamente a fosforilação do NF- κ B no tecido colônico dos animais com colite experimental (Figura 14 A). A quantificação (densidade óptica) da expressão da p-p65 NF- κ B, está representado na figura 14 B, onde é possível observar aumento significativo na expressão do NF- κ B no grupo veículo + DSS3%, e a redução significativa da expressão da p-p65 NF- κ B no cólon dos animais com colite experimental que foram tratados com miricitrina (10 mg/kg). Esses resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório da miricitrina parece também estar relacionado à sua capacidade em modular a atividade do NF κ B no modelo de colite experimental induzida pelo DSS em camundongos, o qual, por sua vez, inibiria a transcrição de inúmeros mediadores inflamatórios.

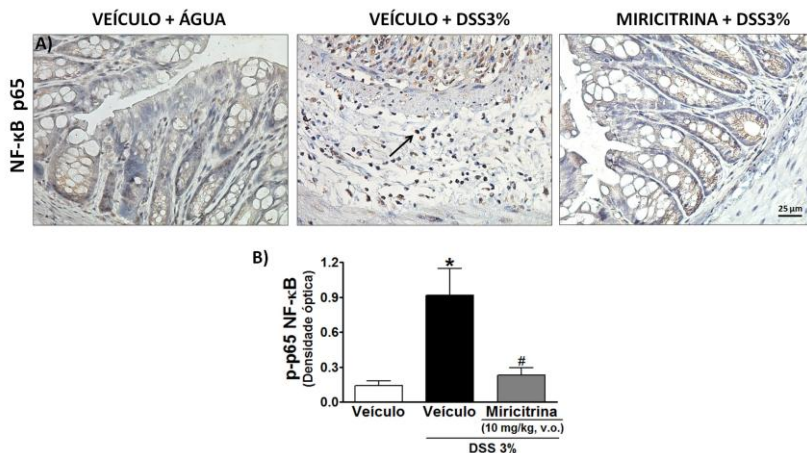


Figura 14. Efeito do flavonoide miricitrina sobre a ativação do NF-κB no cólon dos animais com colite experimental induzida por DSS. A determinação dos níveis da forma fosforilada da subunidade p65 do NF-κB no tecido colônico foi realizado através da técnica de imunohistoquímica. (A) Representação da imunomarcagem para a forma fosforilada da p-p65 do NF-κB, no corte histológico do cólon dos diferentes grupos experimentais: veículo, veículo + DSS3% e miricitrina 10 mg/kg + DSS 3%. A escala da barra corresponde a 25 μm e aplica-se a todos os cortes histológicos. As setas indicam a imunomarcagem positiva. (B) Quantificação da imunomarcagem para a p-p65 NF-κB apresentada no painel A, representado pela média da densidade óptica obtida dos diferentes grupos experimentais. O tratamento com miricitrina reduziu de forma significativa a ativação do NF-κB no tecido colônico dos camundongos com colite experimental, quando comparados com o grupo veículo + DSS 3%. Os resultados representam a média de 4-6 animais por grupo, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao veículo + DSS 3%. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

5.9 Efeito do flavonoide miricitrina e sua forma aglicona, miricetina, sobre a secreção de citocinas em cultura primária de macrófagos estimuladas com LPS.

Após vinte e quatro horas de incubação com LPS (1 μg/mL), o sobrenadante da cultura de macrófagos foi coletado e preparado para dosagem da citocina TNF-α, pela técnica de imunoenensaio ELISA. A figura 15 apresenta os níveis de TNF-α no sobrenadante da cultura de macrófagos, onde foi observado que a incubação com LPS (1 μg/mL) estimulou significativamente a secreção de TNF-α na cultura primária de macrófagos. Além disso, foi possível observar que a incubação com a forma aglicona miricetina (10 e 100 μg/mL), reduziu de forma significativa a secreção de TNF-α quando comparado ao grupo controle LPS. Entretanto, a pré-incubação com o composto miricitrina (100

$\mu\text{g/mL}$), não apresentou redução nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ na presença do LPS ($1 \mu\text{g/mL}$). Vale ressaltar que a pré-incubação com a forma aglicona (miricetina) ou com miricitrina em meio de cultura sem adição de LPS não interferiu significativamente nos níveis de $\text{TNF-}\alpha$ quando comparados ao grupo controle + meio (sem indução com LPS) (Figura 15).

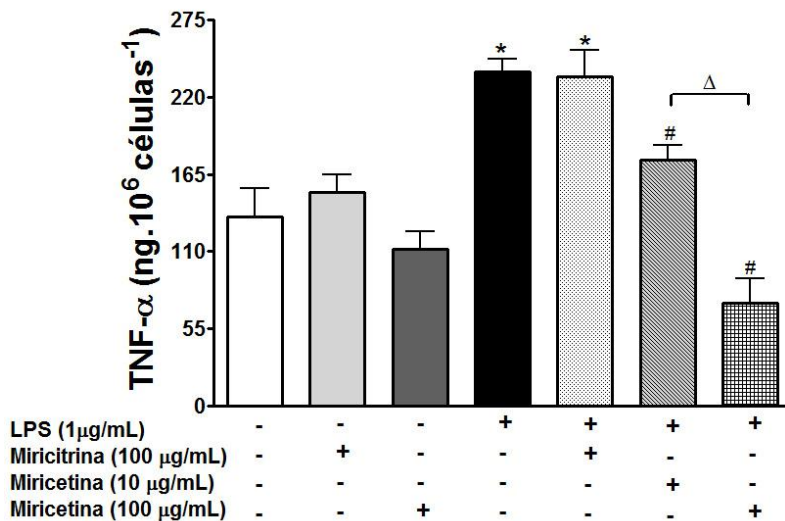


Figura 15. Efeito do flavonoide miricitrina sobre a secreção de $\text{TNF-}\alpha$ em cultura primária de macrófago induzida por LPS. Os níveis da citocina $\text{TNF-}\alpha$ foram quantificadas no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulada com LPS. A incubação de macrófagos com LPS ($1\mu\text{g/mL}$) resultou no aumento significativo da secreção de $\text{TNF-}\alpha$ quando comparada com o grupo que não recebeu LPS (barra branca) . A pré-incubação com o flavonoide miricitrina, na sua forma glicosilada ($100 \mu\text{M/poço}$) não foi capaz de inibir a secreção de $\text{TNF-}\alpha$ de macrófago após a estimulação com LPS ($1\mu\text{g/mL}$). Entretanto, a pré-incubação com o flavonoide miricetina, molécula aglicona da miricitrina, reduziu de forma significativa a secreção de $\text{TNF-}\alpha$ em macrófagos tratados com LPS ($1\mu\text{g/mL}$), nas duas concentrações testadas, 10 e 100 $\mu\text{M/poço}$. Os resultados representam a média de 4 análises por grupo amostral, e as linhas verticais, o erro padrão da média. * $p<0,05$ quando comparado ao controle. # $p<0,05$ quando comparado ao controle + LPS. (ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Student Newman-Keuls).

5.10 Atividade antinociceptiva da miricitrina na hiperalgesia mecânica referida no abdômen.

Já foi descrito na literatura que a administração intracolônica de TNBS em camundongos induz hiperalgesia mecânica na região abdominal (caracterizada por resposta de hipersensibilidade nociceptiva pronunciada e prolongada) (Zhou *et al.*, 2008). Por essa razão, foi avaliada a atividade do flavonoide miricitrina sobre a hiperalgesia mecânica abdominal em camundongos com colite experimental induzida pelo DSS. Conforme apresentado na figura 16, verificou-se que a colite experimental induziu hiperalgesia mecânica nos animais, evidenciada pela redução no limiar de retirada e/ou contração do abdômen frente à estimulação mecânica com o filamento de Von Frey (0,008 g - 2,0 g), a partir do segundo dia de indução. Entretanto, o flavonoide miricitrina (30 mg/kg), inibiu de forma significativa a hiperalgesia mecânica no abdômen induzida pelo DSS em camundongos. Conforme pode ser observado na figura 16, a hiperalgesia mecânica foi reduzida pela miricitrina já no início do desenvolvimento do processo inflamatório, ou seja, a partir do segundo dia de indução.

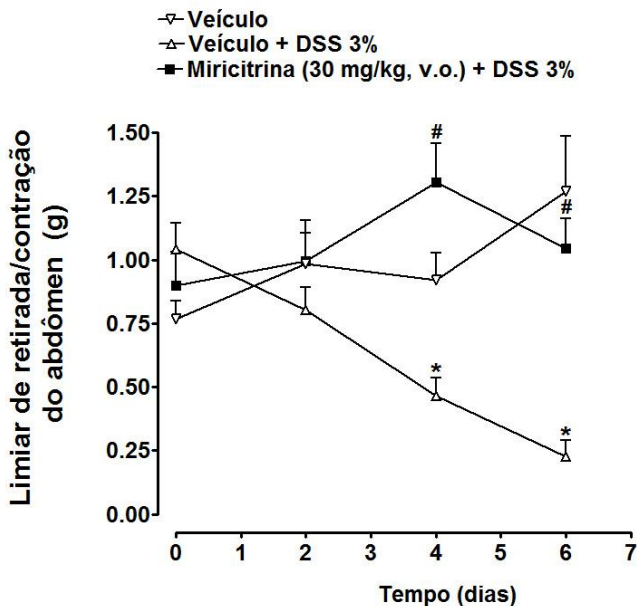


Figura 16. Efeito da administração oral de DSS 3% na sensibilidade dos camundongos frente a uma estimulação mecânica na região abdominal e ação antinociceptiva da miricitrina na hiperalgesia mecânica referida no abdômen. Um dia antes e durante todo protocolo experimental (2º, 4º e 6º dia após indução) de colite induzida por DSS em camundongos, a sensibilidade, frente a uma estimulação mecânica no abdômen dos animais, foi monitorada. Os dados representam a média do limiar de retirada/contração do abdômen quando filamentos de Von Frey, de diferentes forças, foram aplicados (10 aplicações/dia) no abdômen dos animais. No segundo dia após indução da colite experimental, os camundongos que receberam DSS 3% desenvolveram hiperalgesia mecânica, a qual foi protegida pelo tratamento com miricitrina (10 mg/kg, v.o.). Cada ponto representa a média da resposta de retirada/contração do abdômen \pm o erro do padrão da média de 8 a 10 animais. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo + DSS 3%. (ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

5.11 Padronização do método analítico para quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de camundongo e rato

5.11.1 Em plasma de camundongo

Para a seleção da fase móvel, diferentes solventes foram testados: combinação de água (fase móvel A) com diferentes solventes (fase móvel B), dentre eles, o álcool metílico e acetonitrila, adicionados ou não, de ácido fórmico 0,1%. Além disso, foram avaliados diferentes

métodos de eluição, como: método isocrático (proporção da fase móvel A e B, 50:50 e 10:90, respectivamente) e método gradiente (de 5 à 56% de fase móvel B, compreendido num tempo total de análise que variou de 13 até 33 minutos). A fase móvel e o método de eluição selecionados foram: ácido fórmico aquoso 0,1 % (fase móvel A) e metanol + 0,1% ácido fórmico (fase móvel B), e modo gradiente de eluição, uma vez que, estas foram às condições que mostraram uma melhor separação, simetria dos picos e resolução para a análise da miricitrina em plasma de camundongo. A adição do ácido fórmico na fase móvel foi necessária para aumentar a ionização dos compostos na amostra.

A fase estacionária utilizada foi uma coluna de fase reversa, C18, semi-micro (5µm,150mm×2.0mm;Shimadzu) acoplada a uma guarda coluna (5µm,5mm×2.0mm; Shimadzu), a qual apresentou uma melhor resolução para os compostos presentes na amostra. O tempo de retenção da miricitrina, nas condições de análise utilizadas, foi de aproximadamente 23 minutos. O tempo total de análise foi de 33 minutos, o mesmo não pode ser reduzido, devido aos outros interferentes presentes no plasma que co-eluíam com a miricitrina.

Para determinação do padrão interno, diversos compostos foram injetados no sistema cromatográfico pré-determinado para análise da miricitrina, dentre eles, o composto baicaleína, a epicatequina, a quercetina, o ácido caféico e a cafeína. Entretanto, a epicatequina foi o composto selecionado para ser utilizado como PI do método, pois apresentou um pico cromatográfico bastante simétrico e tempo de retenção (aproximadamente 17 minutos) próximo, mas não igual, ao tempo de retenção do composto de interesse.

Para a determinação do método de extração da miricitrina do plasma de camundongo, foram testadas as seguintes técnicas de extração: extração de fase sólida, na qual foi empregado o solvente metanol como solvente eluente; e a técnica de precipitação de proteínas, na qual as proteínas plasmáticas foram precipitadas com diferentes solventes, tais como: metanol, acetonitrila e acetona. O método escolhido para a extração da miricitrina e epicatequina (PI) do plasma de camundongo foi o método da precipitação de proteína, com o solvente acetona, uma vez que estas foram as condições que apresentaram maior eficiência de extração, além de apresentarem, reprodutibilidade e repetibilidade, dentro dos limites preconizados pela ANVISA e FDA.

A fim de determinar o modo mais intenso de ionização e os íons majoritários formados pela miricitrina e do PI, a análise por espectrometria de massas com interface ESI foi realizada primeiramente pelo método de varredura completa (Scan), nos modos negativo e

positivo. O pico base escolhido para a quantificação da miricitrina foi o íon de m/z 463 [M-H] e para a epicatequina foi o m/z 289 [M-H], ambos no modo negativo de ionização. Após a seleção dos pico base e escolha do modo de ionização, a quantificação da miricitrina em plasma foi realizada no modo íon seletivo de monitoração (SIM).

5.11.2 Em plasma de rato

A análise da miricitrina em plasma de rato foi realizada utilizando um equipamento de maior sensibilidade (descrito na seção *materiais e métodos*, item 4.15.2), e cujo sistema suporta maior pressão gerada durante a análise, permitindo a utilização de colunas cromatográficas de tamanho reduzido (cerca de 50 mm de comprimento), as quais possibilitam a realização de análises mais rápidas. Para a escolha da fase estacionária foram testadas colunas de fase reversa C18 e C8. A coluna cromatográfica selecionada foi uma coluna C18 (50 mm x 2mm) por apresentar uma alta resolução tanto para a miricitrina, quanto para a quercetina, além de permitir uma análise em curto período, cerca de 5,5 minutos.

Para a seleção da fase móvel empregada, diferentes solventes foram testados: combinação de água (fase móvel A) com diferentes solventes (fase móvel B), dentre eles, o álcool metílico e acetonitrila, ou a mistura destes, adicionados ou não, de ácido fórmico 0,1% ou ácido acético 1 mM. Além disso, também foram avaliados diferentes métodos de eluição, como: método isocrático (proporção da fase móvel A e B, 50:50 e 10:90, respectivamente) e método gradiente (de 10 à 90% de fase móvel B, compreendido num tempo total de análise que variou de 5 até 7 minutos). A fase móvel e perfil de eluição escolhidos foram: gradiente linear de água + ácido acético 1 mM (fase móvel A) e acetonitrila:metanol (50:50) + ácido acético 1 mM (fase móvel B), uma vez que estas condições permitiram a eluição dos compostos de interesse com alta resolução, simetria, seletividade e em um curto período de análise.

Para determinação do padrão interno, diversos compostos foram injetados no sistema cromatográfico pré-determinado para a miricitrina, dentre eles, a epicatequina e a quercetina. Entretanto, a quercetina apresentou maior sensibilidade de ionização e, portanto, foi o composto escolhido como padrão interno.

Para a determinação do método de extração dos compostos de interesse do plasma de rato, foi testada apenas a técnica de extração por

precipitação de proteína, e para tanto, foram testados diferentes solventes: metanol, acetonitrila, e a mistura destes solventes (2:2 e 1:3, metanol:acetonitrila). O solvente que apresentou maior eficiência de extração e repetibilidade dentro dos limites aceitáveis foi a mistura de acetonitrila e metanol, nas proporções 1:3.

A fim de determinar os íons majoritários e seus principais produtos de fragmentação obtidos através da análise da miricitrina em LC-MS/MS, primeiramente, foi realizada a análise por infusão direta de soluções padrão, na concentração de 1 µg/mL, de miricitrina e da quercetina (PI), e, os parâmetros de ionização do equipamento foram ajustados no modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) até que os compostos atingissem maior intensidade de ionização. O modo negativo de ionização ([M-H]) foi o escolhido, uma vez que este apresentou maior sensibilidade de ionização para ambos os compostos. Desta forma, os íons gerados a partir da ionização dos compostos de referência, foram: m/z 463,2 (íon precursor) \rightarrow 270,4 (íon filho) para a miricitrina e, m/z 301 (íon precursor) \rightarrow 150 (íon filho) para a quercetina.

A tabela 6 apresenta um resumo dos principais parâmetros que foram selecionados e padronizados para a quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de camundongo ou rato.

Tabela 6 – Padronização do método analítico para quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de camundongo e em plasma de rato.

	Fase Estacionária (Coluna)	Fase móvel	Extração do Plasma	Detector	Analizador	Padrão interno
Plasma de camundongo	C18 semi-micro (150mm x 2mm)	Água e metanol + 0,1% ácido fórmico	Precipitação de proteína: acetona	MS	Simples - Quadrupolo	Epicatequina
Plasma de rato	C18 semi-micro (50mm x 2mm)	Água e metanol + 1mM de ácido acético	Precipitação de proteína: acetonitrila : metanol (1:3)	MS/MS	Triplo- quadrupolo	quercetina

5.12 Validação do método analítico para quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de camundongo e rato

Uma vez estabelecidas às condições cromatográficas e a técnica de preparo das amostras, a etapa de validação da metodologia

empregada para análise da miricitrina, tanto em plasma de camundongo como em plasma de rato, foi realizada a partir da análise dos seguintes critérios: seletividade, sensibilidade (limite de detecção e quantificação), linearidade, precisão e exatidão (intra- e inter-dia), recuperação, efeito de matriz e estabilidade.

5.12.1 Seletividade

Um método é definido como seletivo quando os compostos de interesse, presentes em uma amostra são eluídos em tempos diferentes, e também, com tempo de eluição diferente dos possíveis interferentes da matriz biológica (Green, 1996; Thompson, 2002; Brito, 2003). Diante da análise das amostras de plasma branco de camundongo e de rato extraídas a partir da técnica de precipitação de proteína (figuras 17 A e 18 A, respectivamente), foi observado que, não há nenhum interferente da matriz biológica sendo co-eluído com os analitos de interesse. Além disso, o método analítico empregado para análise do composto miricitrina tanto em plasma de camundongo, como em plasma de rato, permitiu a completa separação do pico da miricitrina em relação ao pico dos compostos utilizados como PI (epicatequina e quercetina, respectivamente), conforme mostrado nas figuras 17 B e 18 B. Sendo assim, o método analítico padronizado neste trabalho, para quantificação da miricitrina em plasma de roedores, mostrou-se um método seletivo.

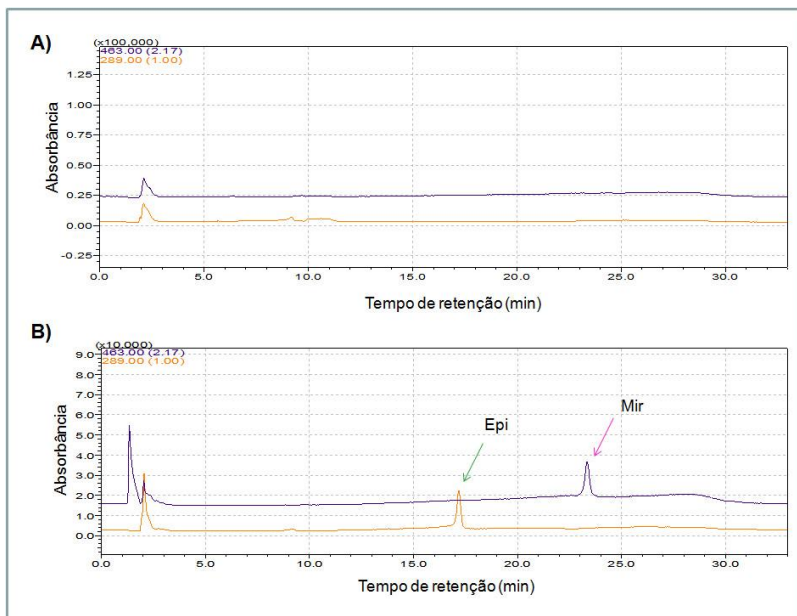


Figura 17. Avaliação da seletividade do método analítico empregado para quantificação da miricitrina em plasma de camundongo. (A) Cromatograma representativo do plasma branco de camundongo após ser submetido ao procedimento de extração através da técnica de precipitação de proteínas, utilizando o solvente acetona. (B) Perfil cromatográfico das soluções padrão de miricitrina e epicatequina (PI).

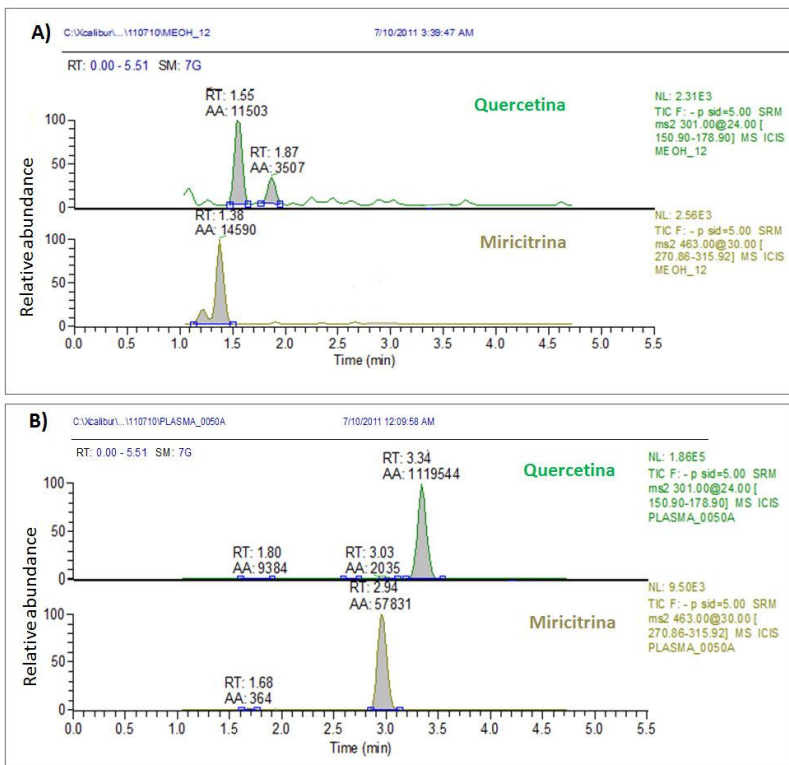


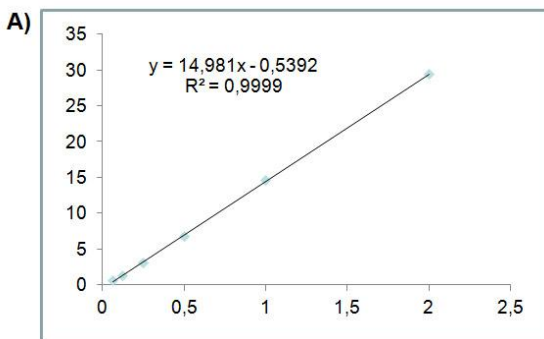
Figura 18. Avaliação da seletividade do método analítico empregado para quantificação da miricetrina em plasma de rato. (A) Cromatograma representativo do plasma branco de rato após ser submetido ao procedimento de extração pela técnica de precipitação de proteína utilizando a mistura de acetonitrila e metanol (1:3). (B) Perfil cromatográfico das soluções padrão de miricetrina e quercetina (PI).

5.12.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo específico (Brasil, 2003; FDA, 2001).

Para a determinação da linearidade do método de quantificação para a miricetrina por HPLC-MS foram construídas curvas de calibração, em triplicata através da fortificação de plasma branco de camundongo com solução padrão de miricetrina em seis diferentes

concentrações. O método analítico empregado para a quantificação da miricitrina em plasma de camundongo apresentou boa linearidade na faixa de 0,062 à 2,0 $\mu\text{g/mL}$, com média \pm desvio padrão do coeficiente de correlação linear (R^2), igual a $0,9994 \pm 0,00071$. A linearidade do



método pode ser visualizado na figura 19 A.

Figura 19. Determinação da linearidade do método analítico empregado para quantificação da miricitrina em plasma de camundongo. (A) Curva média de calibração da miricitrina em plasma de camundongo ($n=3$), na faixa de 0,062-2,0 $\mu\text{g/mL}$.

A linearidade da análise do método de quantificação da miricitrina em plasma de rato foi avaliada de maneira semelhante à anteriormente descrita, entretanto, neste caso, foram utilizados 7 pontos de calibração para construção da curva. As amostras foram preparadas em triplicata. A partir da obtenção das curvas de calibração, foi possível determinar o coeficiente de correlação linear de cada curva. O método analítico empregado para a quantificação da miricitrina em plasma de rato apresentou boa linearidade na faixa de 0,025 à 1,6 $\mu\text{g/mL}$, com média \pm desvio padrão do coeficiente de correlação linear (R^2), igual a $0,9986 \pm 0,0016$. A linearidade do método pode ser visualizada na figura 19 B.

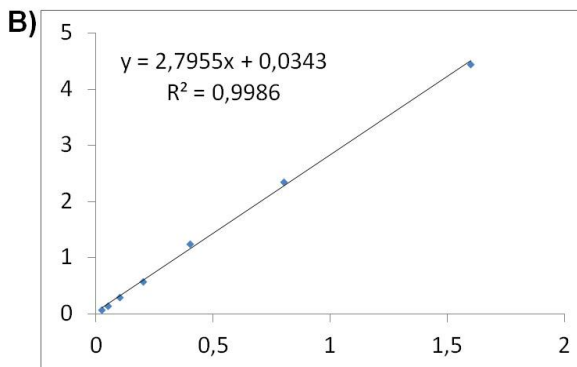


Figura 19. Determinação da linearidade do método analítico empregado para quantificação da miricitrina em plasma de rato. (B) Curva média de calibração da miricitrina em plasma de rato ($n=3$), na faixa de 0,025-1,6 $\mu\text{g/mL}$.

5.12.3 Sensibilidade

A sensibilidade de um método cromatográfico é definida pelo valor obtido para o LD e LQ do mesmo. O limite de detecção (LD) constitui a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, através das condições experimentais estabelecidas ((F.D.A, 2001; Thompson, 2002; Brasil, 2003). O limite de quantificação é definido como a menor concentração do analito, que pode ser quantificada na amostra, com exatidão e precisões aceitáveis e sob as condições experimentais adotadas (Brito, 2003).

A partir da construção da curva analítica, em quadruplicata, elaborada com valores próximos ao limite de detecção, foram obtidas as equações da reta. Os valores do coeficiente linear e angular de cada uma das equações da reta que foram geradas estão descritos na tabela 7. Esses valores foram utilizados para calcular o limite de detecção e o limite de quantificação em plasma de camundongo. Os valores do LD e LQ foram calculados através das equações 1 e 2 (apresentadas na seção *materiais e métodos*). O valor do LD encontrado foi de 0,0202 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para o LQ o valor encontrado foi de 0,0612 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 7. Análise estatística para a determinação do LD e LQ da miricitrina em plasma de camundongo.

CURVA	Coefficiente linear	Coefficiente angular
1	0,341	12,774
2	0,345	12,746
3	0,349	8,582
4	0,369	10,006
Média	0,351	11,023
Desvio padrão	0,0128	2,084

$$\text{LD} = 3,3 \times (0,0128/2,084) = 0,020 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{LQ} = 10 \times (0,0128/2,084) = 0,061 \mu\text{g/mL}$$

Para determinação dos limites de detecção e quantificação do composto miricitrina em plasma de rato, o método de inspeção visual foi utilizado. O valor do LD encontrado foi de 8 ng/mL, e o valor do LQ foi de 25 ng/mL, sendo que este último representou a menor concentração da curva de calibração.

5.12.4 Recuperação

A recuperação determina a eficiência da técnica utilizada para extrair o analito de interesse de uma matriz complexa, ou seja, a relação entre a quantidade do analito, recuperada após o processamento da amostra, em relação à quantidade real presente na amostra (FDA, 2001; Thompson, 2002; Brasil, 2003).

A recuperação da extração de miricitrina do plasma de camundongo pelo método de precipitação de proteína com o solvente acetona, variou de 70,8 à 83,1 %, conforme mostrado na tabela 8. Sendo assim, podemos dizer que o método de extração utilizado permitiu uma eficiente e reprodutível recuperação da miricitrina em plasma de camundongo.

Tabela 8. Eficiência de extração da miricitrina do plasma de camundongo (n = 5, média ± DP).

Concentração Nominal (µg/mL)	Média da recuperação de processamento (%)
Miricitrina	
0,062	75,5 ± 0,709
0,25	83,1 ± 6,304
1,0	70,8 ± 5,731

Os valores de recuperação obtidos após extração de miricitrina do plasma de rato, pelo método de precipitação de proteína com a mistura de solvente acetonitrila e metanol (1:3) apresentaram variação entre 76,1% à 106,7% para a miricitrina, e foi igual a 99,87% para o PI, conforme mostrado na tabela 9. Desta forma, o método de extração utilizado, permitiu uma ótima e reprodutível recuperação da miricitrina em plasma de rato.

Tabela 9. Eficiência de extração da miricitrina e quercetina (PI) do plasma de rato (n = 5, média ± DP).

Concentração Nominal (µg/mL)	Média da recuperação de extração (%)
Miricitrina	
0,075	76,1 ± 6,369
0,3	86,0 ± 3,438
1,2	106,7 ± 6,679
Quercetina (0,2)	99,9 ± 5,587

5.12.5 Estudo do efeito de matriz para análise da miricitrina e da quercetina em plasma de rato

O estudo do efeito de matriz é a análise da possível interferência da matriz biológica na ionização/eluição do composto de interesse no método analítico utilizado (FDA, 2001). Valor de efeito de matriz $\geq 100\%$ indica uma intensificação ou aprimoramento da ionização, e, valor de efeito de matriz $\leq 100\%$ indica supressão iônica (Singh *et al.*, 2010).

O efeito de matriz foi expresso como a razão entre a área média do pico das amostras de plasma branco de rato fortificadas com miricitrina e PI somente após procedimento de extração, com a área média do pico de soluções padrão de miricitrina e de PI em metanol, nas mesmas concentrações. Conforme podemos observar na tabela 10, o efeito de matriz em plasma de rato foi de aproximadamente 15% para a miricitrina, e, irrisório para a quercetina. Além disso, conforme o esperado, o efeito de matriz foi observado de forma reprodutível entre as diferentes amostras QC da miricitrina analisadas.

Tabela 10. Análise do efeito de matriz (plasma de rato) sobre a miricitrina e a quercetina, utilizando sistema LC-MS/MS (n=5, média \pm DP).

Concentração Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Média do efeito de matriz (%)
Miricitrina	
0,075	84,4 \pm 3,569
0,3	84,4 \pm 5,187
1,2	84,1 \pm 9,288
Quercetina (0,2)	99,8 \pm 7,968

5.12.6 Precisão e Exatidão

A precisão de um método analítico avalia a dispersão de resultados entre ensaios repetidos e independentes, de uma mesma amostra, em condições experimentais definidas. Quanto mais próximos os valores experimentais obtidos, mais preciso é o método analítico

(FDA, 2001; Thompson, 2002; Brasil, 2003). A exatidão de um método analítico, também denominada de Tendência ou BIAS, é definida como a concordância entre o valor obtido experimentalmente com o valor nominal ou de referência, aceito, convencionalmente como, o valor real ou verdadeiro (FDA, 2001; Thompson, 2002; Brasil, 2003).

Para a determinação da exatidão e da precisão do método analítico empregado para identificação e quantificação da miricitrina em plasma de camundongo, as amostras controle de qualidade, nos três níveis de concentração, foram preparadas em quintuplicata. Os dados descritos na tabela 11 mostram que o método utilizado apresenta precisão, inter e intra-dia, dentro dos valores aceitáveis pela ANVISA e o FDA, uma vez que o coeficiente de variação variou entre 5,13-12,44%. De forma semelhante, o método apresentou boa exatidão, tendo em vista que os valores de concentração encontrados variaram entre 89,9 e 118,0% quando comparado com à concentração nominal, e estão dentro dos valores aceitos pelos órgãos regulamentadores.

Tabela 11. Determinação da precisão e da exatidão da miricitrina em plasma de camundongo através do ensaio intra-dia (n=5) e inter-dia (n=15)

MIRICITRINA	0,062 µg/mL (LQC)	0,25 µg/mL (MQC)	1,0 µg/mL (HQC)
Intra-dia Precisão^{a)} (%CV) Exatidão^{b)} (%)	5,1 ± 0,023	12,4 ± 0,335	7,7 ± 0,901
	118,0 ± 2,187	97,2 ± 10,118	91,8 ± 6,801
Inter-dia Precisão^{a)} (%CV) Exatidão^{b)} (%)	10,9 ± 0,055	7,9 ± 0,011	10,1 ± 0,027
	115,0 ± 3,252	93,2 ± 4,461	89,9 ± 2,761

a) O valor da precisão é expresso como: CV (%) ± DP;

b) O valor da exatidão é expresso como: média (%) ± DP (%).

A determinação da exatidão e da precisão do método analítico empregado para identificação e quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de rato, foi realizada de modo semelhante as análises

realizadas em plasma de camundongo, entretanto, além das amostras LCQ, MQC e HQC, foram também avaliadas a precisão e exatidão para as amostras LLOQ e Dil-QC. Conforme podemos observar na tabela 12, o método utilizado apresenta ótima precisão, inter e intra-dia, uma vez que o coeficiente de variação variou de 1,85 à 9,72 %, além de boa exatidão, visto que os valores de concentração encontrado variaram entre 90,70 e 104,0% quando comparado com à concentração nominal. Estes resultados estão de acordo com os valores preconizados pelos órgãos regulamentadores, ANVISA e FDA.

Tabela 12. Determinação da precisão e da exatidão da miricitrina em plasma de rato através do ensaio intra-dia (n=6) e inter-dia (n=18)

MIRICITRINA	0,025 µg/mL (LLOQ)	0,075 µg/mL (LQC)	0,3 µg/mL (MQC)	1,2 µg/mL (HQC)	1,0 µg/mL (Dil- QC)
Intra-dia Precisão^{a)} (%CV)	3,9 ± 0,009	9,7 ± 0,007	2,7 ± 0,007	4,9 ± 0,057	5,7 ± 0,057
Exatidão^{b)} (%)	94,3 ± 3,642	94,3 ± 0,688	91,8 ± 2,936	96,4 ± 5,678	99,5 ± 6,081
Inter-run Precisão^{a)} (%CV)	2,8 ± 0,006	3,9 ± 0,003	2,8 ± 0,007	1,8 ± 0,022	3,9 ± 0,041
Exatidão^{b)} (%)	91,4 ± 1,902	92,1 ± 4,183	90,7 ± 3,002	98,1 ± 2,179	96,0 ± 4,098

a) O valor da precisão é expresso como CV (%) ± DP;

b) O valor da exatidão é expresso como média (%) ± DP (%).

5.12.7 Estudo da estabilidade da miricitrina após extração do plasma de rato

A estabilidade é definida como o tempo (dias, meses e anos) e condições de armazenamento (temperatura de estocagem) nos quais o composto de interesse mantém suas características físico-químicas (Brasil, 2003; FDA, 2001). A estabilidade, pós-preparação do flavonoide miricitrina foi avaliada a partir da análise de amostras

controle de qualidade (LQC, MQC e HQC) em replicatas (n=5) após serem submetidas à técnica de extração do plasma de rato. As amostras foram avaliadas quanto a estabilidade após 3 ciclos de congelamento e descongelamento, e, após permanecerem no amostrador por 24h à 4°C. Conforme podemos observar na tabela 13, a miricitrina apresenta-se estável após ser submetida a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, ou mesmo, quando armazenada no amostrador por 24h.

Tabela 13. Estabilidade do composto miricitrina após procedimento de extração em plasma de rato (n = 5, média ± DP).

Concentração Nominal (µg/mL)	Área média das amostras injetadas imediatamente pós extração	Área média das amostras após 24h armazenada em temperatura ambiente	(%) Estabilidade do Amostrador
Miricitrina			
0,075 (LQC)	0,456 ± 0,308	0,466 ± 0,198	102,2
0,3 (MQC)	2,048 ± 0,014	2,046 ± 0,018	99,9
1,2 (HQC)	6,584 ± 0,211	7,164 ± 0,063	108,8
Concentração Nominal (µg/mL)	Área média das amostras injetadas imediatamente pós extração	Área média das amostras após 3 ciclos congela-descongela	Estabilidade após 3 ciclos congela-descongela (%)
Miricitrina			
0,075 (LQC)	0,412 ± 0,012	0,432 ± 0,013	102,0
0,3 (MQC)	1,791 ± 0,150	1,788 ± 0,172	99,8
1,2 (HQC)	6,586 ± 0,149	6,584 ± 0,301	99,8

5.13 Estudo de farmacocinética do flavonoide miricitrina em camundongo

O estudo do perfil farmacocinético de um composto, através da avaliação dos seus parâmetros farmacocinéticos, é fundamental para o conhecimento do comportamento desta molécula no organismo.

A tabela 14 resume os principais parâmetros farmacocinéticos da miricitrina calculados pela análise não-compartimental utilizando o software WinNonlin[®]. Os dados mostram que a miricitrina apresenta uma concentração máxima de 9,549 µg/mL após sua administração pela via intravenosa. Além disso, é possível observar que o composto apresenta um tempo de meia-vida de distribuição bastante curto, cerca

de 17 minutos. De forma semelhante, os dados mostram que a miricitrina apresenta baixo volume de distribuição (285 mL/kg), característico de compostos que são amplamente degradados e/ou apresentam alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas.

Tabela 14 – Parâmetros farmacocinéticos após administração única de miricitrina na dose de 3 mg/kg em camundongos pela via intravenosa (n=5)^a.

Parâmetros^b	Média	Erro Padrão
C_{máx} (ug/mL)	9,549	0,819
C₀ (ug/mL)	79,991	12,327
K_e (1/min)	0,040	0,002
t_{1/2} (min)	17,231	0,712
AUC (min*ug/mL)	275,488	36,723
V_z (mL/kg)	285,021	29,531
CL (mL/min/kg)	11,691	1,579

a) Os dados foram calculados utilizando análise não-compartimental.

b) AUC = do inglês, área under the curve; C_{máx} = concentração máxima; C₀ = concentração extrapolada para o tempo 0 (min); K_e = constante de eliminação; t_{1/2} = tempo de meia-vida; CL = clearance; V_z = volume de distribuição.

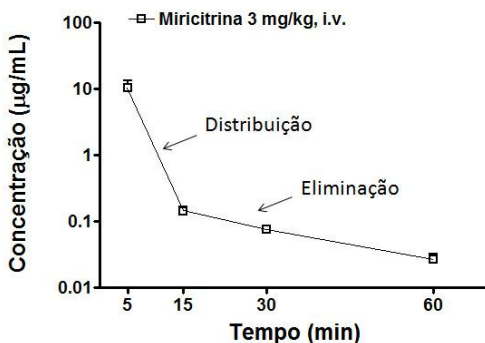
Conforme podemos observar na figura 20 A, o perfil da concentração plasmática *versus* tempo após administração i.v. da miricitrina apresenta duas fases (bifásico), subdivididas em uma rápida fase de distribuição e rápida fase de eliminação.

Entretanto, embora o perfil farmacocinético da miricitrina pela via intravenosa apresente um modelo bifásico, não foi possível calcular os parâmetros farmacocinéticos seguindo o modelo bi-compartimental

pelo software WinNonlin, provavelmente, devido aos poucos pontos de coleta obtidos (4 pontos para cada camundongo), uma vez que, após o período de 60 minutos, a concentração de miricitrina no plasma de camundongo estava abaixo do LQ, e por esta razão não pode ser quantificada.

A figura 20 B mostra o cromatograma observado em uma amostra de plasma coletada e processada após 15 minutos da administração i.v da miricitrina.

A)



B)

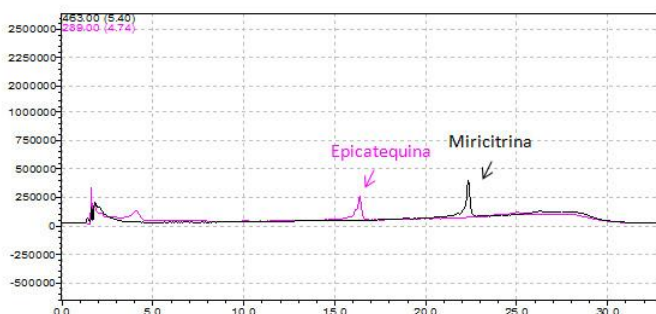


Figura 20. Perfil da concentração plasmática versus tempo e cromatograma representativo de uma amostra coletada após 15 minutos da administração i.v. da miricitrina em camundongos. A) Perfil da concentração plasmática da miricitrina em função do tempo após administração intravenosa na dose de 3 mg/kg em camundongos (n = 5). **B)** Representação cromatográfica da amostra de plasma de camundongo coletada após 15 minutos da administração i.v. da miricitrina em camundongos. Em rosa, o pico correspondente do PI e, em preto, da miricitrina.

Entretanto, quando a miricitrina foi administrada pela via oral em camundongos, na dose de 30 mg/kg, não foi possível detectá-la no plasma destes animais durante todo o tempo de análise (12 horas) (Figura 21), e conseqüentemente, não foi possível obter o perfil da concentração da miricitrina em função do tempo, e, nem mesmo, calcular os parâmetros farmacocinéticos e a biodisponibilidade deste composto após sua administração oral em camundongos.

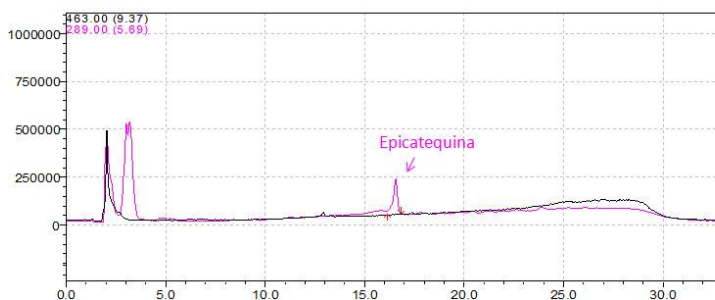


Figura 21. Representação cromatográfica da amostra de plasma de camundongo coletada 30 minutos após a administração oral de miricitrina (30 mg/kg) em camundongos. Em rosa, o pico correspondente do PI.

5.14 Estudo de farmacocinética do flavonoide miricitrina em rato

A tabela 15 resume os principais parâmetros farmacocinéticos da miricitrina em plasma de rato, calculados pela análise não-compartimental. Os dados mostram que a miricitrina apresenta concentração máxima de 45,78 ug/mL após sua administração pela via i.v.. Além disso, os dados mostram que o flavonoide é amplamente distribuído para os tecidos, uma vez que o mesmo apresentou um alto volume de distribuição, cerca de 2,9 L/kg, e é eliminado do organismo de forma mais lenta, quando comparado ao $t_{1/2}$ de eliminação observado em camundongos.

Tabela 15 – Parâmetros farmacocinéticos após administração única de miricitrina na dose de 2 mg/kg em ratos pela via intravenosa (n=6)^a.

Parâmetros^b	Média	Erro Padrão
C_{máx} (ug/mL)	45,783	22,426
C₀ (ug/mL)	73,686	41,087
K_e (1/min)	0,003	0,001
t_{1/2} (min)	309,071	74,059
AUC (min*ug/mL)	580,782	181,324
V_Z (mL/kg)	2872,634	1317,560
CL (mL/min/kg)	5,528	1,951

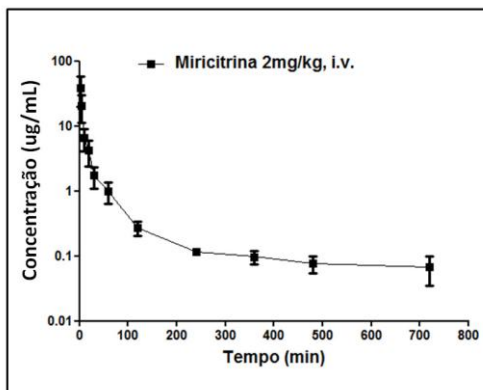
a) Os dados foram calculados utilizando análise não-compartimental.

b) AUC = do inglês, área under the curve; C_{máx} = concentração máxima; C₀ = concentração extrapolada para o tempo 0 (min); K_e = constante de eliminação; t_{1/2} = tempo de meia-vida; CL = clearance; V_Z = volume de distribuição.

Além disso, conforme mostrado na figura 22 A, o perfil da concentração plasmática *versus* tempo após administração i.v de miricitrina (2 mg/kg) em ratos, também apresentou uma característica bifásica compreendido por uma fase de distribuição rápida, seguida de fase lenta de eliminação. A miricitrina foi quantificada no plasma de rato até 480 minutos após sua administração, entretanto, após esse período, a concentração de miricitrina apresentava-se abaixo do limite de quantificação.

A figura 22 B mostra o cromatograma observado para uma amostra de plasma de rato, coletada e processada após 15 minutos da administração i.v. da miricitrina.

A)



B)

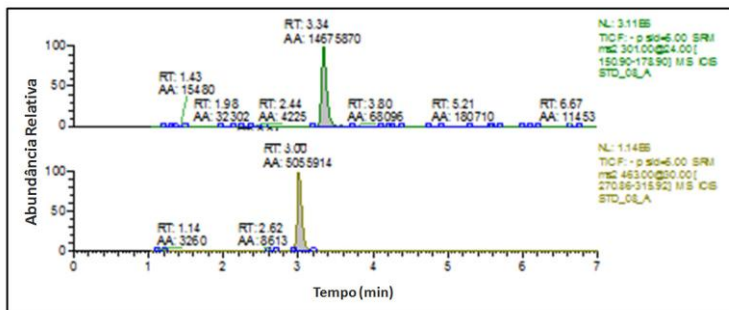


Figura 22. Perfil da concentração plasmática *versus* tempo e cromatograma representativo de uma amostra coletada após a administração i.v. da miricitrina em ratos. **A)** Perfil da concentração plasmática da miricitrina em função do tempo após administração intravenosa na dose de 2 mg/kg em ratos (n = 5). **B)** Representação cromatográfica de amostra de plasma coletado após administração i.v. da miricitrina. Em rosa, o pico correspondente do PI e, em preto, da miricitrina.

Considerando que o perfil farmacocinético i.v. da miricitrina apresenta característica bifásica, os parâmetros farmacocinéticos foram também calculados através do modelo bi-compartimental. Entretanto, os resultados das análises realizadas para o modelo de dois compartimentos

apresentaram altos valores de CV (dados não mostrados), por isto optou-se pelo modelo não compartimental.

Conforme descrito anteriormente, a miricitrina não foi detectada no plasma de camundongo após administração oral da mesma quando avaliado por um período de análise de 12 horas. De forma semelhante, também não foi possível detectar a miricitrina no plasma de rato, mesmo utilizando uma dose maior desse composto (40 mg/kg), e um método analítico mais sensível (Figura 23). Por esta razão, o perfil da concentração da miricitrina em função do tempo, e, os parâmetros farmacocinéticos e a biodisponibilidade deste composto, em plasma de rato, também não puderam ser calculados.

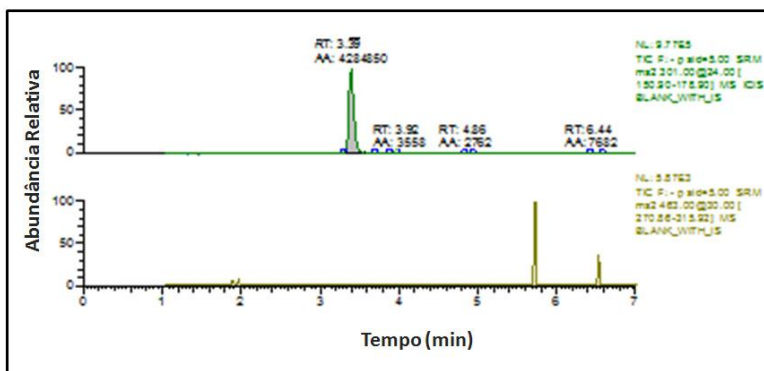


Figura 23. Representação cromatográfica de amostra de plasma de rato coletado após 60 minutos da administração oral de miricitrina (40 mg/kg). O pico em verde refere-se ao PI quercetina, adicionado ao plasma de rato pré-extração. O pico em amarelo, apresenta um possível interferente presente na amostra de plasma de rato.

5.15 Identificação do flavonoide miricitrina e/ou seus metabólitos no plasma e no cólon de camundongo após sua administração durante sete dias consecutivos

5.15.1 Análise das amostras de plasma

Após sete dias de tratamento por via oral com o flavonoide miricitrina, na dose de 10 mg/kg, 1 vez o dia, o sangue dos animais foi coletado e submetido a técnica de extração conforme o método descrito

na seção *materiais e métodos*, item 4.15.3. As amostras foram avaliadas no sistema UPLC-MS/MS (analisador Q-Tof) sob condições instrumentais descritas no item 4.15.2. A análise do m/z gerado após a ionização e fragmentação dos compostos presentes nas amostras de plasma dos animais tratados com miricitrina, foi comparada com a injeção do padrão de miricitrina nas mesmas condições experimentais (*ver anexo 1 e 2*). Além disso, as amostras foram analisadas com auxílio de um software de simulação que comparou os dados obtidos a partir da injeção das amostras de plasma com os obtidos após a simulação da formação de diversos metabólitos, baseados com dados previamente descritos na literatura para compostos pertencentes ao mesmo grupo e subgrupo que a miricitrina.

Primeiramente, foi realizada a análise estatística dos dados utilizando o método PCA (*principal component analysis*) e o *Loading plot*. O resultado desta análise comprovou que, os picos do cromatograma das amostras de plasma branco eram diferentes dos obtidos para a análise de animais tratados, e que, a maioria dos íons detectados está presente na amostra dos animais tratados (dados não mostrados). Adicionalmente, através da análise do gráfico de S Plot (dados não mostrados), foi possível observar que a amostra de plasma branco apresenta perfil cromatográfico de ionização, diferente do apresentado pelas amostras de plasma dos animais tratados.

A miricitrina não foi detectada em nenhuma das amostras de plasma dos animais tratados pela via oral, entretanto, conforme mostrado na figura 24, foi identificada a presença de um composto com tempo de retenção de 0,38 minutos (figura 24 B), que não está presente no plasma branco (figura 24 A).

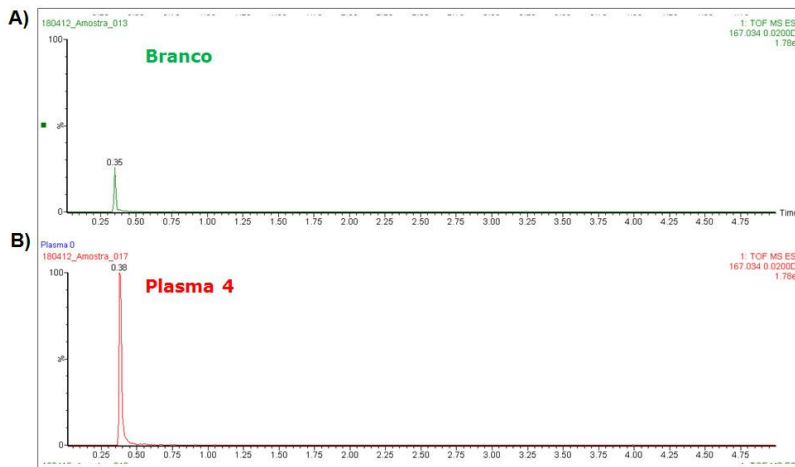
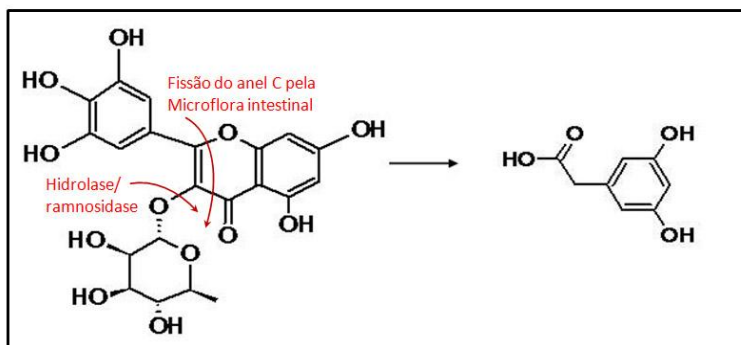
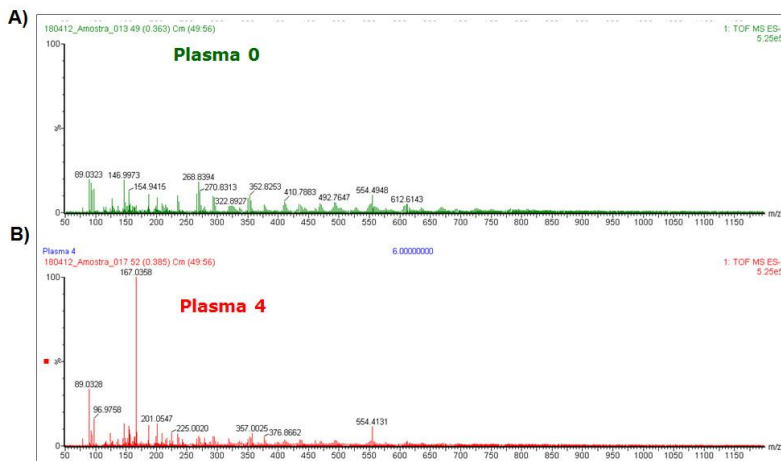


Figura 24. Representação cromatográfica do metabólito, o ácido 3,5-dihidroxifenil acético, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS (n = 6). (A) Plasma branco. (B) Amostra de plasma coletado após sete dias de administração oral com o flavonoide miricitrina na dose de 10 mg/kg.

Devido à alta resolução e reprodutibilidade do equipamento UPLC empregado, foi possível separar um composto de interesse e um interferente da matriz biológica que apresenta tempo de retenção com diferença de apenas 0,3s. Além disso, com o auxílio das análises estatísticas e do software de simulação de metabólitos, foi possível propor que o pico que aparece em 0,38 min nas amostras de plasma de animais tratados com miricitrina é diferente do pico que aparece em 0,36 min na amostra de plasma branco. Estes dados juntamente com dados da literatura sobre a metabolização de outros flavonoides (Manach *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005), sugerem que este pico, com tempo de retenção de 0,38 min e com m/z 167,0358 (Figura 25 A e B), seja o ácido 3,5-dihidroxifenil acético, que é um intermediário liberado a partir da quebra do anel C da aglicona, conforme proposto na figura 25 C.



C)

Figura 25. Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 0,38 min, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS (n = 6). (A) Plasma branco. (B) Amostra de plasma coletado após sete dias de administração oral com o flavonoide miricitrina na dose de 10 mg/kg. (C) Proposta da formação do metabólito ácido 3,5 dhidrofenilacético, formado após metabolização da miricitrina administrada pela via oral em camundongos.

Além do pico em 0,38 min, foi também observado nos cromatogramas obtidos para análise dos animais tratados, um segundo pico com tempo de retenção de 1,10 min e com m/z 397,0245 (Figura 26 B e 27 B, respectivamente), que não foi encontrado em amostras de plasma branco (Figura 26 A e 27 A, respectivamente). Através da

análise estatística pelo método PCA e da simulação de formação de metabólitos, conforme já descritas anteriormente, sugere-se que este pico seja referente à molécula aglicona (miricetina) conjugada com um grupo sulfato (miricetina sulfatada), conforme proposto na figura 27 C.

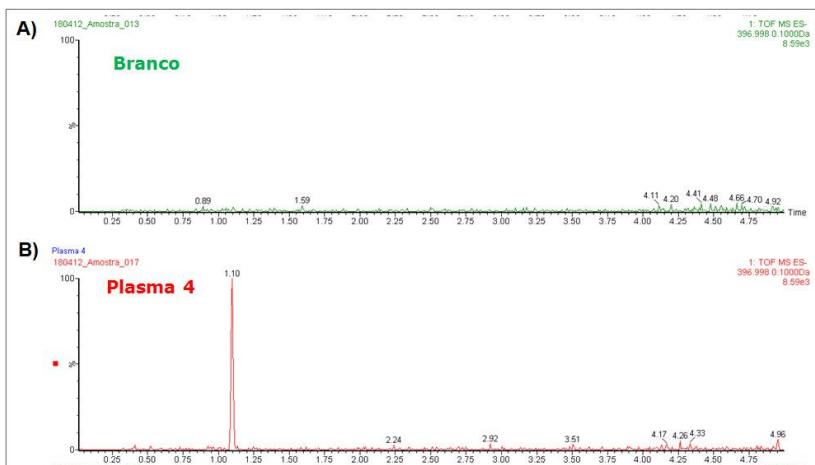
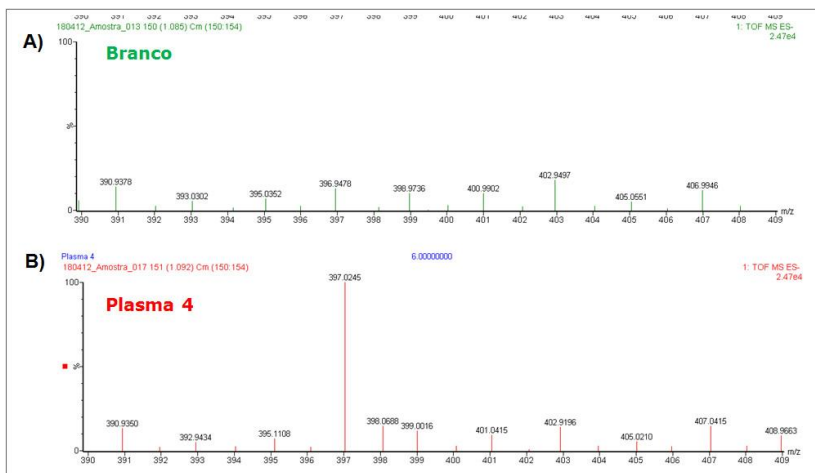


Figura 26. Representação cromatográfica do metabólito, miricetina sulfatada, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS (n = 6). (A) Plasma branco. (B) Amostra de plasma coletado após sete dias de administração oral com o flavonoide miricitrina na dose de 10 mg/kg.



(C)

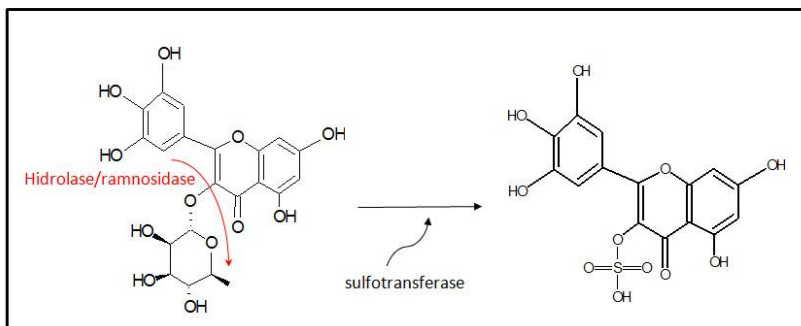


Figura 27. Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 1,10 min, identificado em plasma de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS (n = 6). (A) Plasma branco. (B) Amostra de plasma coletado após sete dias de administração oral com o flavonoide miricitrina na dose de 10 mg/kg. (C) Proposta de hidrólise da miricitrina e sulfonação da porção aglicona, para formação da miricetina na forma sulfatada.

5.15.2 Análise das amostras de cólon

Para a identificação da miricitrina no cólon dos animais tratados com esse flavonoide por sete dias consecutivos, na dose de 10 mg/kg, 1 vez o dia, o cólon dos animais foi removido 90 minutos após a

administração da última dose do composto. O cólon foi homogeneizado e a miricitrina foi extraída e analisada conforme descrito nos itens 4.15.1 e 4.15.2. A análise dos dados foi realizada conforme supracitado para análise das amostras de plasma. A partir dos dados obtidos, a miricitrina administrada pela via oral não foi, em nenhum momento, detectada no cólon dos animais, como mostra a figura 28, assim como o observado nas amostras de plasma. Porém, observa-se a presença de um pico em 0,44 min que não foi detectado nas amostras de cólon branco. A figura 29 mostra o espectro de íons gerados pela análise da amostra em questão e, conforme podemos observar o composto com tempo de retenção de 0,44 min apresenta íon de razão massa/carga igual a 151,0467 (B), o qual não é encontrado na amostra de cólon branco (A). Com auxílio da análise de simulação e baseando-se em dados da literatura sobre a metabolização de flavonoides previamente estudados (Manach *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005), sugere-se que este íon seja referente ao ácido 3-hidroxifenil acético, formado a partir da cisão do anel C da aglicona conforme sugerido na figura 29C.

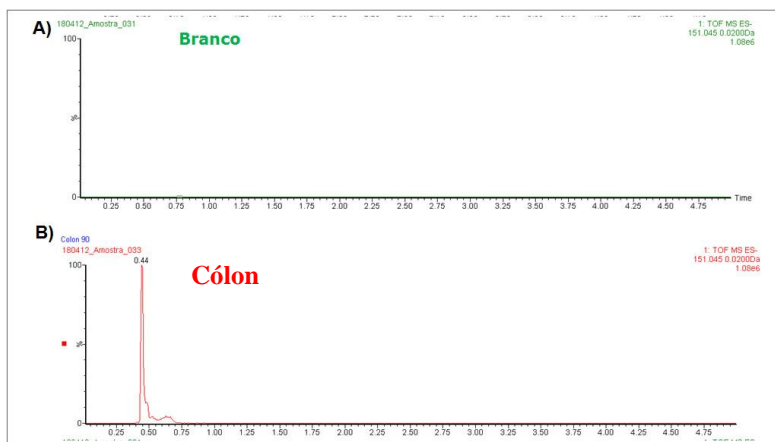
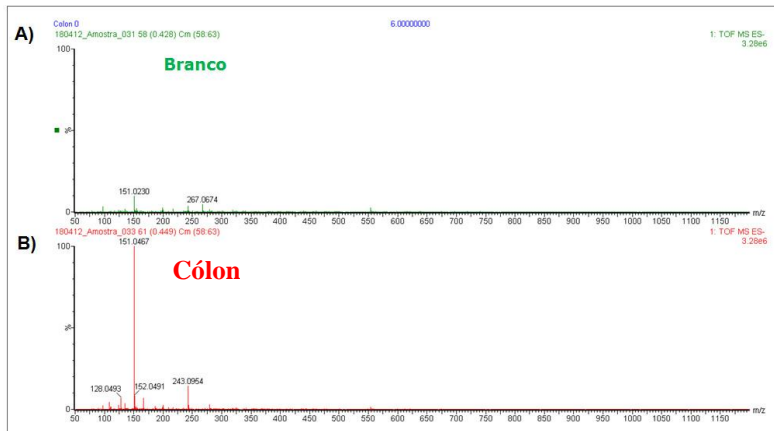


Figura 28. Representação cromatográfica do metabólito, o ácido 3-hidroxifenil acético, identificado em tecido colônico de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS (n = 6). (A) Cólon branco. (B) Amostra de cólon coletado após sete dias de administração oral com o flavonoide miricitrina na dose de 10 mg/kg.



C)

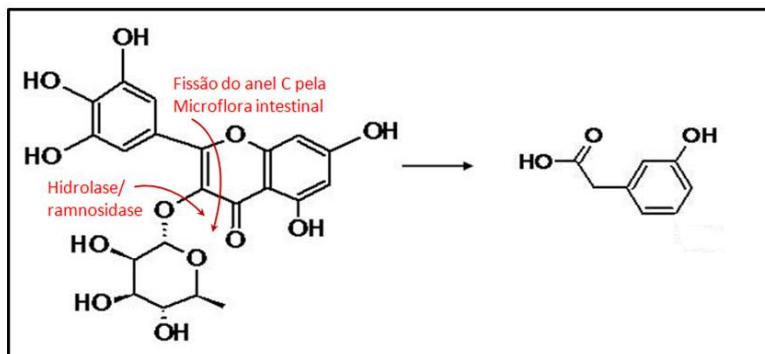


Figura 29. Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 0,44 min, identificado em tecido colônico de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS (n = 6). (A) Cólon branco. (B) Amostra de cólon coletado após sete dias de administração oral com o flavonoide miricitrina na dose de 10 mg/kg. (C) Proposta da formação do metabólito, o ácido 3-hidrofenilacético, formado após metabolização da miricitrina administrada pela via oral em camundongos.

Além do metabólito acima identificado, a análise da amostra do cólon dos camundongos apresentou um composto com tempo de retenção de 0,38 minutos e íon de razão massa carga 167,0436 (Figura 30 B), que não foi encontrado na amostra de cólon branco (Figura 30 A). Este mesmo íon foi encontrado nas amostras de plasma, e refere-se ao íon do ácido 3,5-dihidroxifenil acético, formado pela cisão do anel C da aglicona, conforme sugerido na figura 25C.

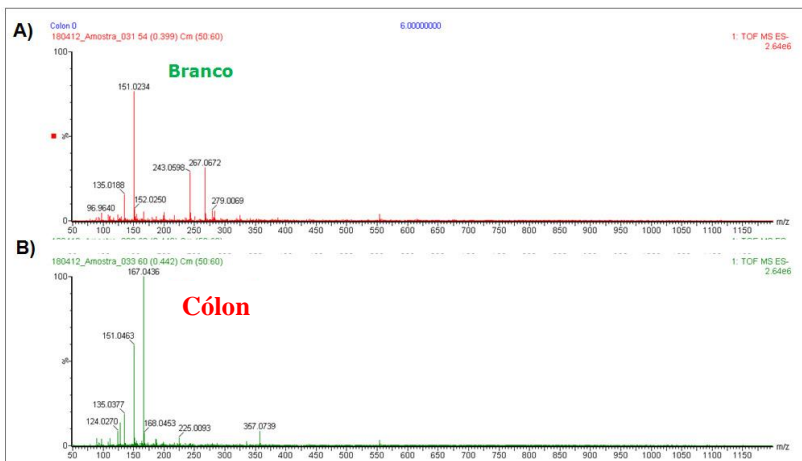
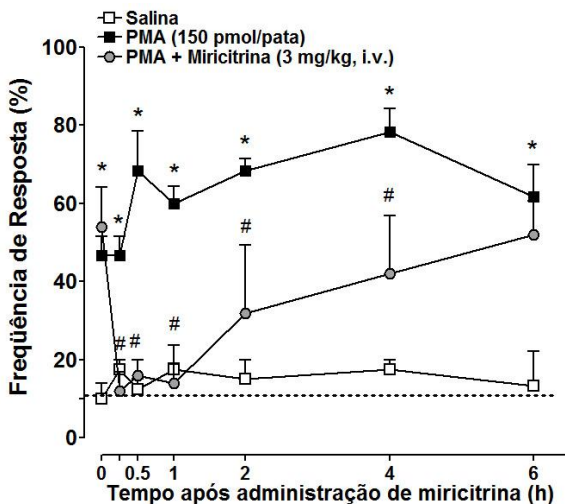


Figura 30. Representação do espectro de íons referente ao pico com tempo de retenção de 0,38 min, identificado em tecido colônico de camundongo após a injeção da amostra no sistema UPLC-MS/MS (n = 6). (A) Cólón branco. (B) Amostra de cólon coletado após sete dias de administração oral com o flavonoide miricitrina na dose de 10 mg/kg.

5.16 Correlação entre a atividade farmacológica do flavonoide miricitrina e seu perfil farmacocinético, após administração pelas vias oral e intravenosa.

A partir da análise da atividade farmacológica da miricitrina no modelo de nocicepção induzida pela injeção de PMA na pata dos animais, podemos observar que a miricitrina apresentou atividade antinociceptiva significativa por até 4 horas após sua administração i.v. (figura 31 A). No entanto, a análise da concentração plasmática da miricitrina (figura 31 B) mostra que foi possível quantificá-la até no máximo até 1 hora após sua administração, devido ao seu curto tempo de meia-vida e amplo volume de distribuição em camundongos. Esses resultados sugerem que a miricitrina, na sua forma glicosilada parece ser a molécula ativa. Por outro lado, o fato da miricitrina apresentar atividade antinociceptiva por até 4 horas após sua administração, sugere que ela esteja sendo rapidamente distribuída e metabolizada e que estes metabólitos formados sejam também responsáveis por parte da atividade farmacológica observada neste modelo.



A)

B)

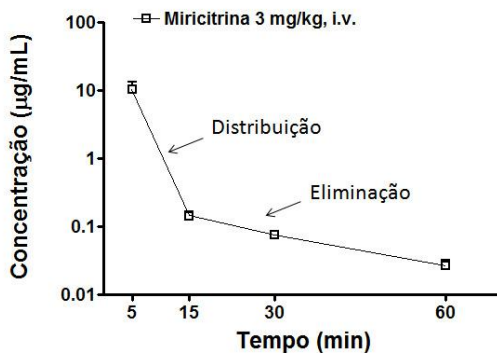


Figura 31. Correlação entre a atividade farmacológica do flavonoide miricitrina e seu perfil farmacocinético, após administração pelas vias oral e intravenosa em camundongo. A) Efeito da alodinia mecânica induzida pela injeção de PMA (1µg/mL) na pata dos camundongos em resposta a 10 aplicações do filamento de Von Frey 0,6 g. Os animais receberam salina ou miricitrina (3 mg/kg,i.v.) 2 horas após a injeção de PMA. A medida do limiar basal foi avaliada antes da injeção de PMA. B) Perfil farmacocinético da miricitrina em plasma de camundongo após administração do mesmo, na dose de 3 mg/kg, pela via i.v.. Os dados foram obtidos 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 360 horas após a injeção com PMA. Os resultados apresentam a média ± S.E.M de 6-8 animais. Os dados foram submetidos à análise estatística de variância de uma via (ANOVA), seguido de pós-teste Student–Newman–Keuls.

Os símbolos representam a diferença significativa entre o grupo salina e o grupo induzido com PMA (*) e entre o grupo apenas induzido com PMA e o grupo induzido com PMA e tratado com miricitrina (#); (---) Representação da medida basal dos animais experimentais.

De forma semelhante, foi observado o efeito antinociceptivo nos animais tratados com miricitrina pela via oral, e este efeito se manteve também por até 4 horas após a sua administração (figura 32). Entretanto, a miricitrina não foi detectada no plasma após sua administração pela via oral, sugerindo que a miricitrina apresente uma baixa absorção ou, alta taxa de metabolização quando administrada por esta via, e que os efeitos antinociceptivos deste composto, observados até 4 horas após, sejam decorrentes da ação dos metabólitos formados.

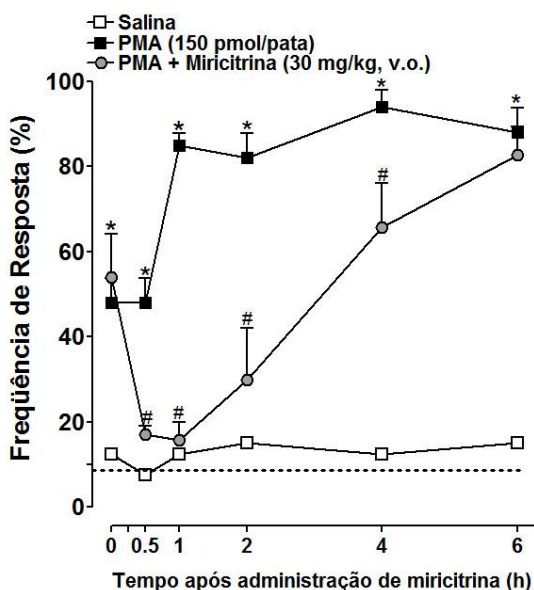


Figura 32. Avaliação da atividade antinociceptiva da miricitrina, administrada pela via oral, no modelo de dor induzida pela injeção de PMA (1µg/mL) na pata dos camundongos. Os animais receberam salina ou miricitrina (30 mg/kg, p.o.) 2 horas após a injeção de PMA. A linha de base foi avaliada antes da injeção de PMA. Os dados foram obtidos 0, 15, 30, 60, 120, 240 e 360 horas após a injeção com PMA. Os resultados apresentam a média ± S.E.M de 6-8 animais. Os símbolos representam a diferença significativa entre o grupo salina e o grupo induzido com PMA (*) e entre o grupo apenas induzido com PMA e o grupo induzido com PMA e tratado com miricitrina (#), através da análise estatística de variância de uma via (ANOVA) seguida de pós-teste Student–Newman–Keuls. (---) Representação da medida basal dos animais experimentais.

5.17 Determinação do coeficiente de partição da miricitrina em octanol/água

O coeficiente de partição octanol/água é um parâmetro usualmente empregado para a determinação da lipofilicidade de um composto, e desta forma, é amplamente utilizado em experimentos de absorção cutânea (Xavier, 2006). A fim de determinar o grau de lipofilicidade da miricitrina, o seu coeficiente de partição (k) foi analisado. O valor de k determinado para a miricitrina foi igual a 0,80.

6. DISCUSSÃO

As doenças inflamatórias intestinais são consideradas como uma desordem inflamatória crônica do trato gastrointestinal e representam um importante problema de saúde pública no mundo. Entretanto, até o presente momento, não existe nenhum medicamento seguro, eficaz e seletivo para o tratamento agudo e crônico das IBDs (Baumgart e Sandborn, 2007a). Sendo assim, a descoberta de novos candidatos e novas terapias para o tratamento das IBDs é extremamente necessário. Neste contexto inserem-se os polifenóis que são compostos amplamente distribuídos em plantas (até o ano de 2009 foram identificados mais de 8000 compostos) e, são consumidos pela população, através da dieta alimentar (Havsteen, 2002). Os flavonoides, um subgrupo derivado dos compostos polifenóis, têm sido amplamente estudados devido às inúmeras propriedades biológicas, dentre elas, destacam-se as atividades anti-inflamatória, analgésica, anticarcinogênica, entre outras (Havsteen, 2002; D'archivio *et al.*, 2007). Estudos conduzidos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os flavonoides são capazes de inibir a produção de diversos mediadores inflamatórios, através da regulação de diferentes vias de sinalização, as quais parecem estar ativadas em pacientes com algum tipo de IBD (Romier *et al.*, 2008). Por essa razão, os flavonoides têm sido estudados na tentativa de desenvolver novas opções terapêuticas para o tratamento das IBDs (Romier *et al.*, 2008).

O composto miricitrina, é um flavonoide glicosilado, pertencente ao subgrupo flavonol, e é o principal constituinte das folhas de *Eugenia uniflora* (Schmeda-Hirschmann *et al.*, 1987). Estudos realizados *in vivo* mostraram que este composto apresenta diversas propriedades biológicas, dentre elas, ação anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante, além de exercer atividade ansiolítica e antipsicótica (Tsacheva *et al.*, 2004; Meotti *et al.*, 2006a; Fernandez *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011). Além disso, estudos *in vitro* mostraram que o flavonoide miricitrina foi capaz de inibir a produção de diversos componentes inflamatórios, dentre eles, COX-2 e NOS2 (Chen *et al.*, 2008), os quais estão associados ao desenvolvimento das IBDs.

Sendo assim, considerando as inúmeras propriedades biológicas já descritas para o flavonoide miricitrina, o objetivo do presente estudo foi avaliar o possível efeito anti-inflamatório deste composto no modelo de colite induzido por DSS 3% em camundongos. Além disso, a fim de determinar o perfil farmacocinético da miricitrina em roedores,

buscamos padronizar e validar o método analítico empregado para a quantificação da miricitrina em plasma de roedores, de acordo com as normas preconizadas pelas agências reguladoras, ANVISA e FDA. Por fim, buscamos identificar a molécula ativa da miricitrina a partir da correlação entre os dados farmacocinéticos obtidos e a atividade farmacológica deste composto.

Nossos resultados mostraram que o tratamento preventivo com a miricitrina, em diferentes doses, foi capaz de melhorar a colite aguda induzida por DSS em camundongos; entretanto, a dose mais eficaz deste composto, foi a de 10 mg/kg de peso corporal. A administração oral com miricitrina preveniu a ruptura das células epiteliais intestinais e lesões do tecido colônico, cujo efeito parece ser decorrente da redução da migração de neutrófilos e redução da expressão e produção de mediadores inflamatórios como, TNF- α , IL-6, bem como, de enzimas associadas com o processo inflamatório como a COX-2 e NOS2. Além disso, o tratamento com a miricitrina foi capaz de reduzir, de forma significativa, a ativação de diferentes vias de sinalização, como o NF- κ B, MAPKs e PKC ϵ , as quais estão criticamente envolvidas na produção destes mediadores e parecem estar ativadas diante de um processo inflamatório intestinal.

Atualmente, vários modelos animais vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de melhor compreender os mecanismos implicadas na patogênese das IBDs. A utilização destes modelos experimentais tem sido fundamental, pois tem permitido um maior entendimento acerca dos mecanismos inflamatórios envolvidos com a indução das IBDs, possibilitando, desta forma, a busca por alvos terapêuticos mais promissores para o tratamento dessas doenças (Jurjus *et al.*, 2004). Os modelos induzidos por agentes químicos, como no caso o DSS, são os mais comumente utilizados por serem capazes de reproduzir vários aspectos imunológicos e histopatológicos observados nas IBDs em humanos (Clapper *et al.*, 2007). O modelo de colite experimental induzida pelo DSS foi primeiramente descrito por Okayasu e colaboradores, no ano de 1990. Neste modelo, a colite aguda é induzida pela administração de DSS na água de beber em concentrações que variam entre 1-6%, por vários dias. Dentre os principais sintomas descritos para a colite induzida pelo DSS em camundongos estão: forte diarreia, presença de sangue nas fezes e perda de peso, os quais em conjunto, indicam o índice da atividade da doença. Além disso, alterações microscópicas também são visualizadas como: presença de ulcerações e inflamação generalizada no tecido do cólon, espessamento

da mucosa e ruptura das criptas intestinais, além de maciça infiltração de granulócitos no sítio inflamatório (Cooper *et al.*, 1993).

No presente trabalho, utilizamos o modelo de colite aguda induzida pelo agente químico DSS em camundongos da linhagem CD1. Os resultados obtidos neste trabalho apresentam as características macro e microscópicas esperadas para este modelo de colite experimental, uma vez que, a administração de DSS 3% causou aumento significativo no índice de atividade da doença e redução do peso corporal, principalmente a partir do quinto dia do protocolo experimental. Além disso, a análise macroscópica do cólon dos animais com colite experimental evidenciou a presença de hiperemia no tecido colônico, com espessamento da mucosa intestinal e presença de fezes mal formadas. Interessantemente, o tratamento com miricitrina, principalmente nas doses de 3 e 10 mg/kg, preveniu a perda de peso corporal, o aumento do índice da atividade, reduziu o dano macroscópico e impediu o encurtamento do cólon dos animais com colite experimental. Além das três doses testadas, 1, 3 e 10 mg/kg, cujos resultados foram apresentadas neste trabalho, a dose de 30 mg/kg também foi avaliada neste modelo experimental (dados não mostrados). Entretanto, os resultados das observações macroscópicas do cólon dos animais mostraram que a redução do dano tecidual colônico foi menor na dose de 30 mg/kg, quando comparado as doses de 3 e 10 mg/kg. Esses resultados indicam a possível atividade dose-resposta para a miricitrina, em formato de curva em U invertido. Especula-se que, em altas concentrações, os flavonoides possam causar enfraquecimento das *tight junctions* no tecido epitelial do intestino, sendo absorvidos antes mesmo de serem metabolizados, e por esta razão, a atividade destes compostos é reduzida (Vissienon *et al.*, 2011).

Conforme descrito anteriormente, o DSS é capaz de induzir a colite experimental em camundongos, através da ruptura da barreira epitelial intestinal (Strober *et al.*, 2002). Corroborando com estes dados, nosso estudo mostrou que a administração de DSS foi capaz de causar dano ao tecido epitelial intestinal com perda considerada das criptas intestinais e infiltração de células inflamatórias. Dessa forma, assim como os estudos realizados por Bento e colaboradores (2011a), nossos dados também mostraram que há uma associação direta entre o aumento da severidade da doença, dano ao epitélio intestinal e o consequente aumento da infiltração de neutrófilos na mucosa do intestino no modelo de colite experimental induzido por DSS. Entretanto, o tratamento com miricitrina foi capaz de reduzir a infiltração de células inflamatórias na camada da sub-mucosa, bem como, preveniu a destruição das criptas

intestinais e preservou as células caliciformes, as quais são responsáveis pela produção de muco e glicoproteínas, cuja função é proteger o epitélio intestinal. Portanto, o tratamento com miricitrina preveniu o dano ao epitélio intestinal causado pela indução da colite com o agente químico DSS.

Os neutrófilos são os leucócitos circulantes em maior abundância nos humanos, representando cerca de 60% de todos os leucócitos circulantes (Smith, 1994). Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa celular do organismo e sua principal função é a destruição de organismos patogênicos. Esses leucócitos são providos de grande variedade de proteínas antimicrobianas, responsáveis pela destruição do patógeno, são elas: enzimas produtoras de espécies reativas de oxigênio, quelantes de vitamina e enzimas capazes de degradar componentes da parede celular (Nemeth e Mocsai, 2012). Entretanto, os vários tipos de metabólitos tóxicos produzidos primeiramente para destruir o patógeno invasor, quando produzidos em excesso, podem também danificar os componentes do tecido do hospedeiro e amplificar a resposta inflamatória (Weiss, 1989; Smith, 1994; Bruno *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2005; Nemeth e Mocsai, 2012). Estudos demonstraram que a ativação excessiva de neutrófilos está associada ao desenvolvimento de inúmeras doenças autoimunes, como a artrite reumatoide, bem como, no desenvolvimento de patologias crônicas, como as IBDs. De fato, estudos no modelo de colite induzida por agentes químicos, mostram que a depleção de neutrófilos, ou o bloqueio da adesão de neutrófilos, são capazes de reduzir o dano tecidual no cólon e o tamanho das ulcerações (Palmen *et al.*, 1995; Natsui *et al.*, 1997). Contudo, os neutrófilos parecem ser uma das principais células responsáveis pelas lesões e disfunções relacionadas às IBDs e, portanto, o bloqueio da migração destas células para o cólon inflamado poderia representar um possível mecanismo para controle do processo inflamatório no intestino.

Nesse contexto, sugere-se a importância das quimiocinas, as quais exercem um papel crucial no recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação. A CXCL1/KC, cujo receptor é o CXCR2, é uma quimiocina que está amplamente envolvida na migração dos neutrófilos e parece estar diretamente relacionada com a gravidade de um processo inflamatório (Bento *et al.*, 2008). Chintakuntlawar e Chodosh (2009), mostraram que a quimiocina CXCL1/KC e seu receptor, CXCR2, são responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos e, conseqüente agravamento do quadro infeccioso no modelo de ceratite adenoviral induzida em camundongos. De forma semelhante, a quimiocina

CXCL1/KC e/ou seu receptor parecem estar associadas ao desenvolvimento das IBDs uma vez que, estudos realizados em cólons de pacientes com UC, apresentaram uma alta taxa de expressão dessa quimiocina (Mazzucchelli *et al.*, 1994). Além disso, a indução de colite experimental em camundongos com deleção gênica para o receptor CXCR2 demonstrou que o dano macroscópico e histológico do cólon desses animais foi drasticamente reduzido quando comparados com os animais selvagens (sem deleção para este receptor) com colite experimental (Buanne *et al.*, 2007). Ademais, Bento e colaboradores (2008) mostraram que o tratamento com anticorpo anti-KC, reduziu significativamente a gravidade da colite experimental induzida em camundongos.

Sendo assim, dada à importância da quimiocina CXCL1/KC no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório e, considerando que o aumento excessivo dessas células inflamatórias está diretamente associado ao dano epitelial intestinal e ao desenvolvimento das IBDs/colite experimental, buscamos quantificar os níveis protéicos da quimiocina CXCL1/KC no tecido colônico dos animais, através do ensaio de ELISA, após indução da colite com o agente químico DSS. Corroborando os dados da literatura, o presente estudo demonstrou que a quimiocina CXCL1/KC apresentou aumento significativo no cólon dos animais que receberam DSS, enquanto que nos animais que foram tratados com miricitrina (10 mg/kg), os níveis proteicos dessa quimiocina estavam significativamente reduzidos. Além disso, esses dados podem ainda ser validados pela análise histológica do cólon dos animais, visto que, foi observado grande quantidade de infiltrado celular na lâmina própria da mucosa intestinal dos animais com colite induzida pelo DSS, enquanto que nos animais que foram tratados com miricitrina, a quantidade de infiltrado celular estava bastante reduzida. Portanto, a partir dos dados obtidos, podemos sugerir que a migração de neutrófilos para o tecido intestinal inflamado estava reduzido no cólon dos camundongos com colite experimental tratados com miricitrina devido, pelo menos em parte, à redução na produção da quimiocina CXCL1/KC.

Está bem estabelecido na literatura que, durante um processo inflamatório intestinal, células inflamatórias, como os macrófagos e neutrófilos, bem como, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais, secretam inúmeros mediadores inflamatórios, dentre eles, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, os quais atuam na regulação dos processos inflamatórios. Além disso, já é sabido que, a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias de forma não balanceada, está diretamente associada

ao desenvolvimento das IBDs. Por esta razão, o papel das citocinas na regulação do sistema imune do processo inflamatório intestinal vem sendo amplamente estudado (Rogler e Andus, 1998a) e representam um alvo interessante para o desenvolvimento de drogas anti-inflamatórias clinicamente relevantes. De fato, estudos clínicos demonstraram que o bloqueio de vários mediadores inflamatórios, principalmente de citocinas pró-inflamatórias, pode proporcionar melhora significativa no tratamento dos pacientes com IBDs (James e Klaproth, 1996).

Dentre as principais citocinas pro-inflamatórias produzidas na fase aguda do processo inflamatório intestinal, destacam-se as citocinas TNF- α e IL-6. Estudos realizados em humanos mostram que, pacientes com IBD apresentam níveis elevados, no intestino e sangue periférico, da síntese das citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Gross *et al.*, 1991), e que essas citocinas são principalmente sintetizadas por macrófagos/monócitos ativados (Reimund *et al.*, 1996). Ademais, inúmeros estudos suportam a idéia de que essas citocinas pró-inflamatórias estejam envolvidas com a amplificação do processo inflamatório, visto que estas citocinas estimulam a secreção de outras citocinas, ou mesmo, são capazes de estimular sua própria liberação através da ativação do sistema imunológico (Reinecker *et al.*, 1993).

Diante do exposto, os níveis da produção da IL-6 e a expressão do RNAm para as citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e TNF- α , no tecido colônico dos camundongos após indução da colite experimental foram avaliados no presente estudo. Os resultados obtidos mostraram que os animais com colite experimental os quais foram tratados com miricitrina (10 mg/kg) apresentaram níveis reduzidos de IL-6 no tecido colônico, bem como, redução da expressão do RNAm para a IL-6 e TNF- α .

O TNF- α , é uma importante citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos e monócitos, e em menores proporções, por neutrófilos, mastócitos, fibroblastos e queratinócitos (Owczarek *et al.*, 2009). Os fatores que estimulam a secreção desta citocina são endotoxinas, antígenos e estresse osmótico; entretanto, a produção desta citocina é influenciada principalmente pela presença de citocinas como IFN- γ e IL-1 β (Owczarek *et al.*, 2009). Quando estimulada, esta citocina desenvolve uma cascata intracelular, estimulando a produção de inúmeras citocinas, e parece participar não apenas da indução do processo inflamatório, mas também da manutenção deste quadro (Van Deventer, 2000; Owczarek *et al.*, 2009). No tecido, o TNF- α estimula as células endoteliais a produzirem moléculas de adesão, propiciando, desta forma, o aumento da infiltração leucócitos no tecido inflamado (Owczarek 2009; Van Deventer, 2000).

Inúmeros estudos em diferentes modelos de colite experimental têm demonstrado que os níveis de TNF- α estão aumentados, principalmente na fase aguda do processo inflamatório, sugerindo que esta citocina pró-inflamatória é responsável pela indução e ativação deste processo (Braegger *et al.*, 1992; Maeda *et al.*, 1992; Katayama *et al.*, 2003; Bento, 2012). Além disso, níveis elevados dessa citocina foram encontrados na mucosa inflamada de pacientes com IBD ativa (Breese *et al.*, 1994). Sendo assim, o TNF- α parece ser uma citocina pró-inflamatória crucial no desenvolvimento das IBDs e, por esta razão, inúmeros estudos clínicos têm avaliado o efeito de anticorpos monoclonais contra o TNF- α nas IBDs (Popivanova *et al.*, 2008). Entretanto, apesar de ser atualmente um dos medicamentos mais eficazes para o tratamento e indução da fase de remissão das IBDs (Popivanova *et al.*, 2008), estudos têm mostrado que um terço dos pacientes não respondem ao tratamento anti- TNF- α e, muitos outros perdem eventualmente a responsividade ou tornam-se intolerantes a esse agente (Melmed e Targan, 2010).

Outra citocina que parece estar diretamente associada à patofisiologia das IBDs, é a IL-6 (Atreya e Neurath, 2005; Bosani *et al.*, 2009). A IL-6 é uma citocina pleiotrópica com papel crucial na regulação imune, inflamação e hematopoiese (Scheller *et al.*, 2006; Bosani *et al.*, 2009; Rose-John *et al.*, 2009). A expressão dos receptores de IL-6 ligados a membrana ocorre principalmente nos hepatócitos, neutrófilos, macrófagos/monócitos e em alguns linfócitos (Scheller *et al.*, 2006; Bosani *et al.*, 2009; Rose-John *et al.*, 2009). Na chamada via clássica, a ativação da IL-6 ocorre a partir da ativação da resposta imune na fase inicial, que consequentemente, ativa a expressão de diversas proteínas de fase aguda (Mitsuyama *et al.*, 2006). Estudos têm mostrado que o aumento nas concentrações de IL-6 e/ou de seu receptor (IL-6R) estão diretamente relacionados ao desenvolvimento da CD, e que o anticorpo anti-IL-6R (Atlizumab ou MRA), causa melhora significativa no quadro clínico dos pacientes com esta desordem inflamatória intestinal crônica (Ito *et al.*, 2004).

Além das citocinas supracitadas, outros componentes inflamatórios que também parecem estar envolvidos com a resposta inflamatória nas IBDs são as enzimas, COX-2 e NOS2 (Rachmilewitz *et al.*, 1995; Hendel e Nielsen, 1997; Agoff *et al.*, 2000) e, por esta razão, também foram analisados no presente trabalho. Vários relatos da literatura têm demonstrado que os flavonoides podem inibir a produção e/ou expressão de COX-2 e NOS2 e, desta forma, reduzir os danos inflamatórios associados ao desenvolvimento da colite experimental

(Liang *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000; Comalada *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005d). Corroborando com estes estudos, os resultados apresentados neste trabalho mostraram que o tratamento oral com o flavonoide miricitrina também foi capaz de reduzir a expressão das enzimas, COX-2 e NOS2, nos animais com colite induzida pelo DSS.

A enzima COX é responsável pela conversão do ácido araquidônico em diversos mediadores inflamatórios e fisiológicos como, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano. As duas isoformas majoritárias da COX, é a COX-1 e a COX 2 (Greenhough *et al.*, 2009). A COX-1 é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos, incluindo o trato gastrointestinal, enquanto que, a COX-2 é uma ciclooxigenase induzível, cuja produção é estimulada por IL-1 β , TNF- α e outros mediadores inflamatórios (Greenhough *et al.*, 2009). Inúmeros estudos demonstram a função crucial da COX-2 nas fases iniciais do processo inflamatório, uma vez que, esta enzima é responsável pela produção de prostaglandina E2 (PGE2), que promove alterações vasculares favorecendo a infiltração de leucócitos, secreção de mediadores químicos e conseqüente amplificação da resposta inflamatória (Greenhough *et al.*, 2009).

Entretanto, embora muitos estudos apontem a COX-2 como uma enzima pró-inflamatória, sobretudo nas IBDs (Agoff *et al.*, 2000; Greenhough *et al.*, 2009), evidências recentes têm apontado a COX-2 como uma enzima responsável pelo reparo do dano tecidual e promotora da resolução da inflamação (McCafferty *et al.*, 1999). Acredita-se que o papel dual da enzima COX-2 esteja relacionado principalmente à fase de indução da doença, ou seja, durante a fase aguda ou fases iniciais do processo inflamatório, a COX-2 produz derivados do ácido araquidônico, como a PGE₂ e o leucotrieno B₄, os quais parecem estar relacionados diretamente com a indução do processo inflamatório. Por outro lado, nas fases de resolução da inflamação intestinal, foram observadas importantes alterações no papel do metabolismo do ácido araquidônico e nos derivados desse ácido, a partir da ação da COX-2, cujos derivados foram capazes de promover a resolução do processo inflamatório intestinal (Wallace, 2006). Corroborando com estes estudos, Bento (2012) mostraram que o aumento da expressão da enzima COX-2 nas fases de recuperação da colite induzida pelo DSS em camundongos, está diretamente relacionado ao reparo e resolução da inflamação intestinal.

A produção de óxido nítrico (NO) tem sido considerada um importante fator envolvido em diversas condições inflamatórias (Roediger *et al.*, 1986; Boughton-Smith *et al.*, 1993; Singer *et al.*, 1996).

O NO é expresso de forma constitutiva, em níveis basais, pela enzima óxido nítrico sintase associada ao endotélio vascular (eNOS ou NOS3) e presente nos nervos (nNOS ou NOS1) (Nathan e Xie, 1994). Entretanto, a forma da NOS capaz de produzir altas concentrações de NO de maneira independente de cálcio, é a forma induzível da NOS, a chamada iNOS ou NOS2 e tem sido implicada na patofisiologia de diversas doenças intestinais (Grisham *et al.*, 1994; Rachmilewitz *et al.*, 1995). A iNOS é uma enzima expressa no endotélio, epitélio e células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos e células mononucleares e pode ser induzida por citocinas ou componentes bacterianos como o LPS. Evidências sugerem que o aumento da expressão de iNOS ocorre principalmente nos neutrófilos (McCafferty *et al.*, 1999). Diante do exposto, considerando que a NOS2 é principalmente expressa pelos neutrófilos e, considerando que nossos resultados mostraram que o tratamento oral com miricitrina foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para o sítio inflamado, é plausível sugerir que a redução na expressão da NOS2 pode estar associada ao efeito da miricitrina sobre a redução da migração de neutrófilos no tecido colônico dos animais com colite experimental.

Atualmente, o papel do NO vem sendo amplamente discutido, uma vez que esta molécula parece ter um papel dual durante o processo inflamatório. Estudos realizados por Zingarelli e colaboradores (1999) mostraram que a mortalidade dos animais deficientes em NOS2 (NOS2^{-/-}) foi significativamente menor (38%) quando comparada aos animais do tipo selvagem no modelo de colite induzida pelo TNBS. Além disso, o grupo verificou que após 4 dias de indução da colite, os animais deficientes em NOS2 apresentavam redução significativa da colite experimental, e no sétimo dia, apresentaram 100% de resolução da colite, enquanto que o tipo selvagem apresentou dano severo a mucosa intestinal após 7 dias de indução da colite. Por outro lado, McCafferty e colaboradores (1999) utilizando o mesmo modelo de colite experimental, demonstraram que nas primeiras 72h de indução da colite, os animais NOS2^{-/-} apresentaram um aumento de 50% no dano macroscópico quando comparado com os animais do tipo selvagem. Porém, sete dias após a indução da colite, não foi observada diferença, relacionada aos parâmetros macroscópicos do cólon, entre os diferentes grupos experimentais (McCafferty *et al.*, 1999).

Já é bem descrito na literatura que o efeito anti-inflamatório dos flavonoides parece estar relacionado a modulação de diferentes vias de sinalização, bem como, na regulação da produção e expressão de mediadores inflamatórios, os quais são responsáveis pela ativação e

perpetuação do processo inflamatório (Jobin *et al.*, 1999; Raso *et al.*, 2001; Kim e Jobin, 2005c). Inúmeros estudos apontam os flavonoides, principalmente do subgrupo flavonol, do qual a miricitrina faz parte, como os inibidores mais potentes das vias de sinalização da PKC, PI3-k e Akt (Agullo *et al.*, 1997; Gamet-Payrastré *et al.*, 1999; Meotti *et al.*, 2006b). Corroborando com estes estudos, Meotti e colaboradores (2006b) demonstraram que o flavonoide miricitrina foi capaz de produzir atividade antinociceptiva pronunciada através da inibição da ativação de duas isoenzimas diferentes da PKC, a PKC α e ϵ . Dessa forma, a fim de determinar a possível via intracelular modulada pelo flavonoide miricitrina no modelo de colite induzida pelo DSS, o papel da enzima PKC foi avaliado neste trabalho. Somando aos resultados acima descritos, o presente estudo demonstrou que o tratamento oral com miricitrina reduziu de forma significativa a imunomarcagem para a PKC ϵ no tecido colônico de camundongos com colite induzida pelo DSS, sugerindo que o flavonoide miricitrina exerce parte dos seus efeitos anti-inflamatórios na colite através da inibição da expressão pela via da PKC ϵ .

A via da PKC desempenha papel crucial na transdução do sinal envolvido na proliferação celular, diferenciação, apoptose, angiogênese e na resposta inflamatória (Griner e Kazanietz, 2007). Estudos recentes demonstraram que a PKC é responsável pela indução da expressão de genes inflamatórios, como a NOS2 (Oh *et al.*, 2007) e pela ativação de NF- κ B (Lallena *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2005). Ademais, produtos formados a partir da ativação dessa cascata de sinalização parecem estar amplamente envolvidos no desenvolvimento das doenças inflamatórias crônicas, como as IBDS.

A PKC é uma família de enzimas proteína quinase envolvidas na modulação de outras proteínas através da fosforilação de grupos hidroxila dos resíduos de aminoácido serina-treonina (Jaken, 1996; Griner e Kazanietz, 2007; Ali *et al.*, 2009). A família da PKC é dividida em três subfamílias de isoenzimas, baseadas na sua estrutura e propriedades bioquímicas, são elas: isoenzima clássicas (cPKC), composta pelas formas α , β 1, β 2 e γ , que são ativadas pelo aumento da concentração de cálcio no meio; a subfamília de isoenzimas novas (nPKC) compreendida pelas formas ϵ , δ , θ , e η , as quais são independentes de cálcio; e, por fim, a subfamília das isoenzimas atípicas, composta por ξ e ι/λ (Jaken, 1996; Griner e Kazanietz, 2007; Ali *et al.*, 2009). É sabido que as subfamílias cPKC e nPKC são ativadas pelo mensageiro secundário lipídico diacilglicerol (DAG) (Jaken, 1996; Griner e Kazanietz, 2007; Ali *et al.*, 2009). A ativação da PKC ocorre a

partir da estimulação dos receptores de tirosina-quinase e receptores acoplados à proteína G, que ativam a fosfolipase C, levando ao aumento dos níveis de DAG na membrana plasmática. O aumento dos níveis de DAG promove re-localização (do citosol para a membrana) e ativa as diversas isoenzimas da PKC (Jaken, 1996; Griner e Kazanietz, 2007; Ali *et al.*, 2009). Esta ligação da PKC à membrana induz alteração conformacional na proteína, permitindo a exposição dos sítios de ligação do domínio quinase (Newton, 2003). Os eventos subsequentes incluem a ativação das vias MEK-ERK (Marshall, 1996; Cai *et al.*, 1997) e PI3K-Akt (Balendran *et al.*, 2000).

Já é descrito na literatura que a ativação da via da PKC pode modular as vias do NF- κ B e das MAPKs (Toton *et al.*, 2011), as quais representam duas vias de sinalização muito importantes na modulação da resposta inflamatória intestinal (Barnes, 1997; Waetzig e Schreiber, 2003). Além disso, estudos mostram que a fosforilação das MAPKs gera um ciclo de retroalimentação positiva na inflamação, uma vez que as MAPKs ativam fatores de transcrição, como o NF- κ B, que regulam a transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias (Carter *et al.*, 1999; Carter e Hunninghake, 2000; Kaminska, 2005). Ademais, o efeito anti-inflamatório dos flavonoides, em diferentes modelos de colite experimental, parece estar associado com a capacidade destes compostos em inibir a via das MAPKs (Kim e Jobin, 2005c) e a via do NF- κ B (Camuesco *et al.*, 2004; Ruiz e Haller, 2006; Ruiz *et al.*, 2007). Contudo, corroborando os estudos supracitados, o presente trabalho demonstrou que o tratamento oral com o flavonoide miricitrina preveniu significativamente a ativação das vias de sinalização, das MAPKs (ERK1/2, JNK1/2, and p38) e do NF- κ B, no tecido colônico dos animais com colite experimental. Esses dados sugerem que a inibição da ativação das vias da PKC, MAPKs e NF- κ B pelo flavonoide miricitrina, pode constituir um mecanismo de ação importante sobre a redução da liberação e/ou expressão de citocinas e enzimas inflamatórias durante a colite experimental.

Em humanos, foram identificadas 3 formas majoritárias da MAPK: a quinase regulada por sinais extracelulares (Kaminska, 2005), a quinase c-Jun N-terminal (JNK) e a MAPK p38. As MAPKs podem ser ativadas por inúmeros estímulos extracelulares, tais como patógenos, LPS, fatores de estresse, e diversas citocinas envolvidas no processo inflamatório, incluindo a IL-1 β , IL-17, TNF- α e IFN- γ (Lewis *et al.*, 1998; Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis e Avruch, 2012). Uma vez ativadas, as MAPKs podem ativar diversos fatores de transcrição, os quais são responsáveis por produzirem mediadores inflamatórios que

estão envolvidos no desenvolvimento e perpetuação do processo inflamatório, ou mesmo na resolução da inflamação (Lewis *et al.*, 1998; Widmann *et al.*, 1999; Kyriakis e Avruch, 2012). Estudos demonstraram que amostras coletadas do intestino de pacientes com IBD apresentaram aumento na expressão de p38 α , em macrófagos e neutrófilos da lâmina própria (Waetzig *et al.*, 2002). Corroborando esses dados, um estudo piloto em pacientes com doença de Crohn demonstrou que o composto inibidor da fosforilação de p38 e JNKs, o CNI-1493, melhorou os aspectos clínicos referentes à doença. Além disso, o composto foi efetivo em 50% dos pacientes que não eram responsivos à terapia com anti-TNF- α (Hommes *et al.*, 2002). Além disso, já foi demonstrado que inibidores da via da JNK apresentaram efeito protetor em roedores com colite experimental (Roy *et al.*, 2008). Desta forma, a via das MAPKs parece representar um alvo importante para o desenvolvimento de novas terapias anti-inflamatórias para o tratamento das IBDs (Kaminska, 2005).

Outra via de sinalização importante no desenvolvimento de doenças inflamatórias é a do NF- κ B (Barnes, 1997; Hayden *et al.*, 2006). A família de fatores de transcrição do NF- κ B é formada por 5 membros: RelA ou p65, cRel, RelB, p105/p50 e p100/p52, que formam dímeros capazes de influenciar a expressão de genes que contenham sítio κ B na sua região promotora. As proteínas p50 e p52 apresentam efeito inibitório sobre a expressão dos genes dependentes de κ B. Por outro lado, as demais proteínas, como a p65, contêm um domínio de transativação que permitem a estimulação da transcrição de genes (Hayden e Ghosh, 2008), os quais codificam vários mediadores pró-inflamatórios como: as citocinas e quimiocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8 e IL-12), receptores de superfície (IL2R e CD40), proteínas imunoregulatórias (moléculas MHC classe I e II), enzimas inflamatórias (NOS2 e COX-2) e moléculas de adesão (ICAM-1 e VCMA-1) (Campbell e Perkins, 2006), que estão diretamente envolvidos com a regulação do processo inflamatório e sobrevivência celular (Hayden e Ghosh, 2008; Wullaert, 2010). De fato, evidências demonstraram que este fator de transcrição está crucialmente associado à patofisiologia das IBDs (Hayden *et al.*, 2006; Wullaert, 2010). Além disso, amostras da mucosa colônica e células mononucleares da lâmina própria, de pacientes com IBD, apresentaram aumento dos níveis nucleares de p65 quando comparada com amostras de indivíduos saudáveis (Ellis *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1998). Estudos realizados em células intestinais epiteliais e macrófagos coletados da mucosa intestinal inflamada de humanos, mostraram que ocorre aumento significativo na expressão do

NF- κ B em ambos os tipos celulares (Rogler *et al.*, 1998b). Corroborando estes estudos, Neurath e colaboradores (1996) mostraram que o tratamento com oligonucleotídeo antisense contra p65 foi capaz de prevenir o desenvolvimento da colite experimental induzida pelo TNBS em camundongos.

Diante do exposto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem de forma geral que a miricitrina exerce sua atividade anti-inflamatória através da inibição de vias de sinalização *upstream*, tais como as vias da PI3-k e PKC ϵ , as quais inibem a fosforilação das MAPKs e do NF- κ B, que consequentemente reduzem, a super-expressão de PKC ϵ , COX-2, iNOS, IL-6, e TNF- α , bem como a migração de neutrófilos e demais células inflamatórias para o tecido inflamado no modelo de colite experimental induzida pelo DSS em camundongos (**Figura 33**).

Atualmente, muitos pacientes com IBD são tratados com analgésicos para o alívio da dor decorrente do processo inflamatório existente, entretanto, esses medicamentos causam vários efeitos adversos (Bielefeldt *et al.*, 2009). Dessa forma, novas terapias para o tratamento da dor em pacientes com IBD devem ser investigadas. Dentre os sintomas apresentados pelos pacientes com algum tipo de IBD, a presença de dor abdominal é comumente observada nestes indivíduos (Baumgart e Sandborn, 2007a). Nesse contexto, este trabalho avaliou se o a indução da colite experimental com DSS poderia induzir a hiperalgesia mecânica nos camundongos e, se o tratamento com o flavonoide miricitrina (30 mg/kg) poderia prevenir esse efeito nos animais com colite experimental. O presente estudo demonstrou que a colite induzida pelo DSS promoveu hiperalgesia mecânica na porção abdominal dos camundongos com colite experimental. Além disso, foi possível observar que o efeito hiperalgésico ocorreu a partir do 4º dia após o início do tratamento com DSS, correspondendo ao momento em que os animais começaram a apresentar os sintomas de inflamação intestinal. Por outro lado, o tratamento oral com miricitrina reduziu de forma significativa a hiperalgesia mecânica induzida pelo DSS.

Estudos da resposta da dor visceral em pacientes com IBD são bastante conflitantes, uma vez que indivíduos com colite ativa aguda apresentam redução da tolerância da dor, enquanto que, pacientes que possuem a doença na forma crônica ou quiescente, apresentam maior tolerância frente a estímulos dolorosos (Bernstein *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2000a; Mayer *et al.*, 2005). Entretanto, estudos mais recentes mostraram que a percepção da dor visceral está diretamente associada ao aumento da migração de células inflamatórias para o local inflamado

durante a fase aguda deste processo e, que a sensação dolorosa, parece ser criticamente influenciada pelo tipo celular dominante no conteúdo intestinal (Cunha *et al.*, 2008). Dessa forma, acredita-se que os linfócitos T, que ocorrem especialmente na fase crônica das IBDs e nos modelos de colite experimental parecem exercer características antinociceptivas e, por esta razão, os pacientes com a doença nesta fase apresentam maior tolerância à dor. Estudos complementares de Verma-Gandhu e colaboradores (2006), demonstraram que a administração aguda de DSS resultou no aumento da sensibilidade na porção abdominal dos animais, uma ação que estava associada aos sinais graves da colite, bem como, ao aumento significativo da atividade da MPO e da produção de IL-1 β (Verma-Gandhu, 2006). Por outro lado, a sensibilidade colônica observada nos animais que receberam DSS de forma crônica estava reduzida e, este efeito estava associado com o aumento do número de células T no sítio inflamatório, sugerindo novamente, o efeito antinociceptivo dessas células na fase crônica do processo inflamatório.

Desta forma, corroborando com os estudos supracitados, nossos resultados mostraram que a percepção da dor visceral está diretamente associada aos sinais inflamatórios da colite aguda induzida pelo DSS. Além disso, considerando que a migração de células inflamatórias para o sítio da inflamação parece contribuir para a indução da sensação dolorosa, sugere-se que o efeito antinociceptivo da miricitrina no modelo de colite experimental aguda está diretamente associada ao seu efeito na redução da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório, cujo resultado foi apresentado anteriormente neste trabalho. Por outro lado, Souza e colaboradores (2002) mostraram que a ativação da via da PKC em tecido periférico leva ao desenvolvimento de resposta nociceptiva espontânea, sugerindo que a ativação desta proteína quinase *in vivo* parece ser essencial para o estabelecimento da resposta nociceptiva induzida (Souza *et al.*, 2002). Dessa forma, é possível que a atividade antinociceptiva da miricitrina observada no modelo da colite induzida pelo DSS poderia ocorrer devido à inibição da ativação da via da PKC, uma vez que, conforme descrito anteriormente, a miricitrina apresenta atividade inibitória sobre esta proteína quinase.

Considerando que a miricitrina reduziu significativamente os níveis teciduais dos mediadores inflamatórios anteriormente descritos, o próximo passo do presente trabalho foi avaliar se a expressão e produção desses mediadores poderia ser apenas uma consequência da diminuição da infiltração celular para o cólon. Para isso, foi avaliado o efeito direto da miricitrina sobre a secreção de TNF- α em cultura primária de macrófagos frente à estimulação com LPS. Os resultados

mostraram que a incubação com LPS estimulou significativamente a secreção de TNF- α na cultura de macrófagos; entretanto, a pré-incubação com miricitrina não foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis desta citocina. Conforme descrito anteriormente, os macrófagos desempenham papel importante no desenvolvimento das IBDs, uma vez que estão associados à produção de altos níveis de citocinas pro-inflamatórias como TNF, IL-6 e IL-1 β (Hanauer e Present, 2003). Diante desses dados, é possível sugerir que a modulação da expressão e produção dos mediadores inflamatórios observados neste estudo parece estar relacionada com a migração leucocitária para o tecido do cólon na colite experimental, e não pela ação direta da miricitrina sobre a produção desses mediadores. Entretanto, para confirmar essa hipótese da ação da miricitrina na modulação da expressão e produção dos mediadores inflamatórios, estudos adicionais são necessários.

Por outro lado, é preciso considerar que o estudo da ação da miricitrina na modulação da expressão e produção dos mediadores inflamatórios em cultura de macrófagos foi realizado em um sistema *in vitro*, e, estudos realizados neste sistema apresentam, muitas vezes, resultados diferentes daqueles observados quando o mesmo composto é analisado em um sistema biológico/*in vivo*. Esses efeitos contraditórios observados estão, geralmente, associados às características físico-químicas e aos aspectos farmacocinéticos do composto que está sendo analisado (Lin e Lu, 1997; Alavijeh e Palmer, 2004). Já é bem descrito na literatura que, grande parte dos compostos quando administrados pela via oral, precisam ser biotransformados para que possam gerar compostos/metabólitos mais ativos, os quais representam nesses casos, a forma ativa deste composto (Lin e Lu, 1997; Alavijeh e Palmer, 2004). Dessa forma, a identificação da forma ativa de um composto no sistema biológico é fundamental para a correta interpretação dos efeitos biológicos do mesmo. Sendo assim, considerando os aspectos acima descritos, a extrapolação dos resultados *in vitro* para o sistema biológico do organismo intacto pode ser muito desafiante e gerar muitas vezes interpretações errôneas. Por essa razão, o conhecimento do perfil farmacocinético de um composto é extremamente necessário para a melhor compreensão e interpretação dos resultados obtidos a partir da análise dos efeitos deste composto em diferentes sistemas, *in vitro* e *in vivo*.

Apesar de inúmeros estudos descreverem com clareza as principais vias pelas quais os flavonoides exercem seus efeitos antiinflamatórios, o estudo do perfil farmacocinético e a forma com que

estes compostos são absorvidos pelo TGI, se na sua forma íntegra (glicosilada), hidrolisada (aglicona) e/ou na forma de metabólitos, é ainda foco de pesquisa. De fato, estudos *in vivo* com o flavonoide quercetina e seus análogos glicosilados mostraram resultados um tanto controversos. Comalada e colaboradores (2005) observaram que a forma aglicona da quercetina foi capaz de reduzir a proliferação de macrófagos *in vitro* após estimulação pelo M-CSF (do inglês, *macrophage-colony stimulating factor*), além de inibir a expressão de IL-1 β , TNF- α e iNOS em cultura de macrófagos estimulada com LPS. Por outro lado, o mesmo grupo demonstrou que a forma glicosilada (quercitrina) não apresentou efeito significativo sobre a redução desses mediadores nas mesmas condições experimentais. No entanto, Kwon e colaboradores (2005) mostraram que a quercetina, na sua forma glicosilada, apresentou efeito antiinflamatório na colite induzida pelo DSS em camundongos. Dessa forma, acredita-se que o efeito contraditório, *in vivo e in vitro*, deste composto pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo diferente perfil farmacocinético dos mesmos, o qual sugere que a forma ativa da miricitina parece não ser sua forma glicosilada, mas sim a forma aglicona formada após o processo de biotransformação no organismo.

Levando em consideração os estudos supracitados, o efeito da pré-incubação com o composto miricetina, que é a forma aglicona do flavonoide miricitrina, sobre a secreção de TNF- α em cultura de macrófagos estimulada com LPS, foi também avaliado. Interessantemente, nossos resultados mostraram que a miricetina reduziu significativamente os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α na cultura de macrófagos estimulados com LPS. Dessa forma, sugere-se que ou o flavonoide miricitrina não é capaz de modular diretamente a produção de citocinas pelas células inflamatórias, ou que a forma ativa do flavonoide, quando administrado pela via oral *in vivo*, é a forma aglicona, formada após processo de hidrólise do composto glicosilado no organismo. Entretanto, para afirmar corretamente a forma ativa *in vivo* da miricitrina, após sua administração pela via oral, foi realizado o estudo do seu perfil farmacocinético.

Para a correta determinação e interpretação dos parâmetros farmacocinéticos de um composto em matriz biológica, o desenvolvimento e a validação de um método analítico são fundamentais para garantir a confiabilidade e assegurar a credibilidade frente aos resultados obtidos (Cass, 2001; Pereira, 2005). Nesse sentido, embora inúmeros estudos apontem o flavonoide miricitrina como uma molécula com grande potencial farmacológico (Meotti *et al.*, 2006a;

Fernandez *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011), não há, até o momento, relatos na literatura referentes ao perfil farmacocinético deste composto.

No presente estudo, foram desenvolvidos e validados dois métodos cromatográficos utilizando a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas para a identificação, quantificação e determinação do perfil farmacocinético da miricitrina, em roedores. Os métodos validados mostraram-se seletivos, lineares, sensíveis, reprodutíveis e, apresentaram precisão e exatidão dentro dos limites preconizados pelas agências regulamentadoras e, por esta razão, puderam ser corretamente aplicados para a determinação do perfil farmacocinético deste flavonoide em ratos e camundongos.

A padronização do método analítico para a quantificação da miricitrina no plasma de camundongo foi realizada em um instrumento LC-MS, cujo analisador consistiu de um quadrupolo simples, enquanto que a padronização em plasma de rato foi realizada em instrumento LC-MS/MS, contendo um analisador do tipo triplo-quadrupolo. Ambos os métodos utilizados foram altamente seletivos e bastante sensíveis. Entretanto, os resultados mostraram que a utilização de um equipamento LC-MS/MS permitiu uma melhor sensibilidade de detecção e de quantificação do flavonoide miricitrina em plasma de rato, quando comparada com a metodologia empregada para quantificação deste mesmo composto em plasma de camundongo. O analisador do tipo triplo-quadrupolo utiliza dois estágios de espectrometria de massas, sendo um deles usado para isolar o íon de interesse e o outro para estabelecer uma relação entre o íon parental e os outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida (sub-produtos). Por esta razão, este analisador é mais seletivo e sensível, além de permitir a redução da interferência espectral de compostos presentes na matriz e de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (Chiaradia, 2008).

Outro componente importante do espectrômetro de massas é a fonte ionizadora. No presente trabalho, a interface eletrospray foi corretamente selecionada uma vez que foi capaz de ionizar os compostos presentes nas amostras de plasma de roedores, bem como permitiu a obtenção de um método seletivo e bastante sensível. A ESI é a técnica de ionização por pressão atmosférica mais utilizada atualmente para a ionização de molécula polar de pequeno tamanho, como por exemplo, os flavonoides, como a miricitrina (Vekey, 2001; Ardrey, 2003). Entretanto, a eficiência de um método analítico por LC-MS não depende apenas da técnica de ionização e do espectrômetro de massas utilizado, mas também, dos componentes compreendidos em um sistema

de LC, como por exemplo, a fase estacionária e a fase móvel (Ardrey, 2003). No presente trabalho, a fase estacionária empregada para ambas às metodologias desenvolvidas foi uma coluna de fase reversa C18, que é ideal para análise de compostos com polaridade intermediária, como os flavonoides, e permite o uso de soluções aquosas no sistema de fase móvel. Entretanto, para a padronização do método em plasma de rato, foi utilizada uma coluna com comprimento menor (50 mm) do que a coluna utilizada para a padronização em plasma de camundongo (150 mm). Desta forma, a redução no comprimento da coluna nos permitiu reduzir aproximadamente seis vezes o tempo total da análise em plasma de rato.

Outra razão pela qual a cromatografia em modo reverso é a mais empregada atualmente é devido à possibilidade de utilização de fase móvel aquosa para análise seletiva dos compostos de uma amostra (Cass, 2001). No presente trabalho, a fase móvel utilizada constituiu de uma mistura de água com solvente orgânico, e, em ambos os métodos padronizados neste trabalho, os compostos de interesse foram eluídos quando o gradiente de eluição apresentava altas concentrações de solvente orgânico (aproximadamente 56%). De fato, é descrito na literatura que a sensibilidade de uma análise é aprimorada quando os compostos presentes em uma amostra são eluídos em altas concentrações de solvente orgânico (Needham *et al.*, 2000; Dams *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005; Kostiainen e Kauppila, 2009). Além disso, a fim de aumentar a resposta de ionização para os compostos estudados, miricitrina e PIs (quercetina e epicatequina), foram adicionados na fase móvel aditivos como o ácido fórmico 0,1% e ácido acético 1 mM, os quais foram capazes de otimizar a sensibilidade da análise, tanto por MS, quanto por MS/MS (dados não mostrados). De fato, inúmeros aditivos e/ou modificadores têm sido amplamente utilizados na fase móvel da LC com a finalidade de melhorar a sensibilidade, resolução e reprodutibilidade da análise (Wu *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2005).

A determinação da técnica de extração do composto de interesse da matriz biológica é outro fator fundamental no desenvolvimento de um método analítico por LC-MS, pois é responsável por eliminar qualquer interferente e/ou contaminante presente na amostra, que possa danificar a coluna cromatográfica ou mesmo interferir com a análise do analito de interesse (Cassiano, 2009). Os resultados apresentados neste trabalho mostram que a técnica de extração utilizada foi empregada com sucesso, pois permitiu que a extração do composto de interesse fosse realizada de forma eficiente e reprodutiva e, livre de qualquer interferente presente na matriz biológica. Conforme descrito na

literatura, a técnica de precipitação de proteína é uma das técnicas mais utilizadas atualmente para a extração de compostos flavonoides da matriz complexa, pois é um método simples, com baixo custo, eficiente e que apresenta boa reprodutibilidade (Zhao *et al.*, 2012).

Para evitar a degradação dos compostos de interesse, miricitrina e PIs presentes nas amostras biológicas de roedores, foram utilizadas durante todo processo de análise, algumas das técnicas já descritas na literatura que permitem a estabilização de moléculas instáveis em matriz complexa (Li *et al.*, 2011) . Para tanto, as amostras de sangue ou de cólon coletados dos animais, foram imediatamente armazenadas em freezer refrigerado à -80°C e, durante o preparo, foram descongeladas e mantidas em gelo (0-4°C) durante todo o procedimento. Da mesma forma, após a etapa de extração dos analitos de interesse da matriz biológica, as amostras foram imediatamente armazenadas em freezer sob temperatura de -80°C. Além disso, para evitar qualquer reação enzimática que pudesse degradar os compostos presentes nas amostras, o pH do meio foi controlado através da adição de solução ácida. Desta forma, o pH do meio foi mantido em um valor de aproximadamente 4,5.

A determinação da estabilidade é uma variável pré-analítica muito importante para a análise e quantificação de compostos presentes em matriz biológica utilizando sistema HPLC-MS/MS (Li *et al.*, 2011). Sendo assim, a fim de determinar a estabilidade da miricitrina diante do método analítico empregado foi realizado o ensaio de estabilidade desta molécula em plasma de rato. Os resultados mostraram que, após o processamento das amostras de plasma contendo miricitrina, estas apresentaram alta estabilidade, mesmo após serem submetidas a 3 ciclos congela (20 °C)-descongela (temperatura ambiente), ou após permanecerem 24h armazenadas à 4°C. Entretanto, a estabilidade da miricitrina, quando armazenada em diferentes temperaturas e por longos períodos de tempo, não foi analisada neste trabalho, e, portanto, deve ser futuramente avaliada.

A instabilidade de um composto pode ocorrer em qualquer estágio do processo bioanalítico, incluindo, coleta da amostra, processamento, armazenamento, extração e até mesmo, durante a análise por sistema cromatográfico LC-MS ou LC-MS/MS (Li *et al.*, 2011). As causas mais comuns da instabilidade de um analito em bioanálise quantitativa por LC-MS ou LC-MS/MS são: degradação da amostra ativada por enzimas, como as esterases, hidrólise dos metabólitos conjugados, reatividade química, degradação fotoquímica ou mesmo, fragmentação e/ou transformação do composto na fonte do espectrômetro de massas (Briscoe e Hage, 2009). Estudos mostraram

que o tempo entre a coleta e o armazenamento das amostras biológicas em freezer é fundamental para evitar a degradação de compostos instáveis, e por essa razão, deve ser o mais curto possível (Eriksson e Bjorkman, 1997; D'esposito *et al.*, 2008). Além disso, durante o processamento das amostras, as mesmas devem ser mantidas em gelo úmido (0-4 °C) para evitar qualquer problema de degradação (Chen e Hsieh, 2005). Outro fator extremamente importante para evitar a degradação de um analito instável, é o controle do pH da amostra. Já é bem descrito na literatura que o pH tem papel fundamental nas reações enzimáticas ou não-enzimáticas catalisadas por ácido ou base (Fura *et al.*, 2003). Além disso, pesquisas também mostraram que o pH de uma amostra de plasma, tratada ou não, pode aumentar para um valor igual a 8,8 quando mantidas sob temperatura ambiente ou a 37 °C, e durante o preparo desta amostra o pH pode chegar até 9,5, resultando na aceleração das reações enzimáticas mediadas pela hidrolases e/ou esterases, as quais são capazes de degradar os composto de interesse presentes na matriz biológica (Fura *et al.*, 2003; Vainchtein *et al.*, 2007).

Outro aspecto que deve também ser considerado durante análise por espectrometria de massas é a possível interferência da matriz na análise do analito, que é capaz de causar alterações nas análises cromatográficas, como: mascaramento do pico do analito de interesse, erro na identificação do analito e aumento do sinal do detector (Pinho, 2009). O estudo sobre o efeito da matriz empregada para análise da miricitrina em plasma de rato mostrou que os constituintes do plasma parecem interferir com a análise do flavonoide miricitrina através do sistema LC-MS/MS, de forma que foi observado uma supressão de aproximadamente 15% na ionização deste composto. Entretanto, o efeito de matriz observado para a miricitrina ocorreu de forma reprodutível entre as replicatas das amostras CQ nos três níveis de concentração em que foram analisadas. Desta forma, é possível observar que o efeito de matriz para o composto miricitrina ocorre de forma semelhante, independente da concentração da amostra analisada, não interferindo com a reprodutibilidade do método analítico em questão.

Após as etapas de padronização e validação do método analítico para quantificação da miricitrina em plasma de roedores, o mesmo foi utilizado com sucesso, nos estudos *in vivo*, para a determinação do perfil farmacocinético deste flavonoide. Este estudo foi realizado separadamente em camundongos e ratos e os dados obtidos foram analisados pelos modelos farmacocinéticos, não-compartmental e de 2 compartimentos. No entanto, a análise dos resultados através do modelo de dois compartimentos apresentou altos valores de CV, e, por isso,

optou-se por analisar os dados farmacocinéticos, a partir do modelo não-compartimental. Esta variação ocorre normalmente porque o modelo compartimental representa uma simplificação do organismo e é altamente dependente da espécie em estudo, além de não considerar outros fatores interferentes como, a ligação do fármaco as proteínas plasmáticas (Vaughan e Hope, 1979; Rohatagi *et al.*, 1997; Nora, 2008; Wolfsegger e Jaki, 2009). O modelo não compartimental apresenta relação anatômica e fisiológica mais realista pois considera a influência de outros fatores como o fluxo sanguíneo e o volume real de sangue presente em cada órgão, permitindo assim uma análise mais fidedigna do perfil farmacocinético de um determinado fármaco, e por esta razão, é o modelo farmacocinético mais utilizado (Rohatagi *et al.*, 1997; Wolfsegger e Jaki, 2009).

A análise do perfil farmacocinético da miricitrina em plasma de camundongo, após administração i.v., mostrou que este flavonoide apresenta um perfil farmacocinético bifásico, incluindo uma fase de distribuição rápida, além de uma fase rápida de eliminação. Os baixos valores apresentados para os parâmetros de farmacocinética como, volume de distribuição, tempo de meia-vida, e, clearance, indicam que, possivelmente, a miricitrina, assim que administrada pela via intravenosa seja rapidamente hidrolisada para formação da molécula aglicona. De fato, estudos mostram que, compostos glicosilados, quando administrados pela via intravenosa são detectados no plasma em baixas concentrações e por um período de tempo bastante curto, além de apresentarem rápida distribuição e eliminação no organismo (Lambert *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011).

Além disso, já está bem estabelecido na literatura que flavonoides glicosilados são rapidamente hidrolisados no organismo, para a formação da molécula aglicona, após sua administração, pelas vias oral ou intravenosa, devido à ação das enzimas hidrolases (para revisão ler (Manach *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005). Adicionalmente, a ligação dos compostos flavonoides a proteínas plasmáticas é outro fator que deve ser considerado, uma vez que estes compostos apresentam alta afinidade por proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. Além disso, relatos da literatura mostram que, a presença de grupos hidroxilas no anel B dos flavonoides, como no caso da miricitrina, aumenta consideravelmente a afinidade destes compostos pelas proteínas plasmáticas (Manach *et al.*, 2004; Xiao e Kai, 2012). Entretanto, para determinar a taxa de ligação da miricitrina com as proteínas plasmáticas estudos adicionais devem ser realizados.

De forma semelhante, os dados farmacocinéticos obtidos para a miricitrina em plasma de rato apresentaram perfil bifásico, sendo compreendido por uma fase rápida de distribuição, porém, com uma fase de eliminação mais lenta e prolongada, que pode ser determinado pelo valor de tempo de meia-vida de aproximadamente 5 horas (cerca de 18 vezes maior que o valor determinado para camundongos). O alto volume de distribuição da miricitrina em plasma de rato (2,97 L/kg), diferente dos dados encontrados em plasma de camundongo, pode sugerir que este composto seja amplamente distribuído para os tecidos periféricos quando administrado em ratos, o que explicaria, pelo menos em parte, o aumento do seu tempo da sua meia-vida de eliminação e a sua menor depuração plasmática deste composto quando comparado aos valores obtidos para camundongo. Além disso, um valor maior da AUC observado em ratos, está de acordo com o menor valor de CL observado, sugerindo uma redução do processo de filtração glomerular ou depuração hepática. Da mesma forma, o valor reduzido da constante de eliminação (K_e) observado no plasma de rato, está de acordo com o valor reduzido do CL obtido. Além disso, o tempo de meia-vida mais longo, observado em ratos, pode ser explicado pela utilização de um método analítico mais sensível, o qual permitiu que o composto fosse detectado por mais tempo no plasma. Por outro lado, as diferenças entre os parâmetros farmacocinéticos obtidos para camundongos e ratos neste estudo, podem ser atribuídas as diferenças fisiológicas e bioquímicas existentes entre as espécies, como por exemplo, a variabilidade na expressão das enzimas metabolizadoras, principalmente do sistema CYP 450, as quais podem interferir nos processos de metabolização de uma droga (Sharma e Mcneill, 2009; Toutain *et al.*, 2010).

Outro parâmetro farmacocinético observado que apresentou diferença significativa entre ratos e camundongos foi a concentração máxima obtida após administração intravenosa da miricitrina. Em ratos a $C_{máx}$ foi muito superior aquela encontrada em camundongos, cerca de cinco vezes maior. Além das diferenças supracitadas entre as espécies, os dados contraditórios podem ser explicados pela forma com que o composto foi administrado nos animais. Em ratos, a administração do composto ocorreu pela cânula inserida na veia jugular dos animais, ou seja, o composto foi injetado diretamente na circulação sistêmica e os problemas relacionados a perda de volume não ocorre. Em camundongos, a administração intravenosa ocorreu pelo plexo ocular. Quando um composto é administrado pelo plexo ocular, pode ocorrer muitas vezes, pequeno extravasamento de sangue após punção do plexo, o que leva a uma perda considerada da quantidade total de composto

administrado ao animal. Além disso, através da administração pelo plexo ocular, não é possível visualizar se a administração do composto está sendo completamente injetada na veia. Entretanto, apesar dos problemas apresentados pela administração de um composto pelo plexo ocular, os valores encontrados para a miricitrina em plasma de camundongo, apresentaram pouca variabilidade entre os animais e podem ser visualizados pelos baixos valores de erro padrão apresentados no gráfico da curva da concentração em função do tempo.

Além da determinação do perfil farmacocinético pela via intravenosa, o presente trabalho buscou avaliar também o perfil farmacocinético da miricitrina pela via oral. No entanto, a miricitrina não foi detectada em concentrações quantificáveis em ambas as espécies avaliadas durante todo o tempo de análise (12 horas), e por isso, a biodisponibilidade oral deste composto não pode ser determinada. Contudo, é sugerido que a miricitrina, quando administrada pela via oral, seja rapidamente hidrolizada e biotransformada no organismo.

Os resultados do presente trabalho corroboram os dados da literatura, os quais mostram que os flavonoides apresentam baixa biodisponibilidade quando administrados pela via oral (Piskula e Terao, 1998; Crespy *et al.*, 1999; Piskula *et al.*, 1999; Scalbert *et al.*, 2002). Um dos fatores responsáveis pela baixa biodisponibilidade de um composto refere-se à baixa taxa de absorção e ampla distribuição do mesmo, o que está diretamente relacionado às suas características físicas-químico, como por exemplo, sua lipofilicidade (Xavier, 2006; Budha *et al.*, 2008). Sendo assim, a determinação da lipofilicidade de um composto é extremamente importante para predição da taxa de absorção oral do mesmo (Xavier, 2006).

Desta forma, a fim de determinar a característica lipofílica do flavonoide miricitrina e da sua forma aglicona (miricetina), estudos do coeficiente de partição (P), óleo/água (o/a), destes compostos foram realizados. Os resultados do presente estudo mostraram que a miricitrina apresenta baixa lipofilicidade, uma vez que, o coeficiente de partição calculado foi inferior a 1, e por esta razão, a sua passagem pela membrana biológica é reduzida. De fato, estudos da permeabilidade da miricitrina em linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano (células Caco-2) mostraram que a maior concentração deste composto ficou retida na porção apical, e que apenas 0,68% de miricitrina (100 μ M) permearam as células (Yokomizo e Moriwaki, 2005a).

Outro aspecto bastante relevante quanto à absorção dos flavonoides, é o fato de que a taxa de absorção desses compostos é influenciada pela ligação de um açúcar a esses compostos, e, ao tipo de

açúcar ligado. Estudos de Gee e colaboradores (1998) mostraram que compostos glicosilados tendem a proteger o composto de uma possível degradação na porção superior do TGI, e que esta característica está relacionada ao tipo de açúcar ligado a molécula. De fato, estudos de Muellen e colaboradores (2008) mostraram que a quercetina glicosilada, quando administrada pela via oral, permanece em altas concentrações no estômago dos animais, por até 1 hora após a sua administração. Ademais, estudos sugerem que compostos fenólicos que possuem um açúcar do tipo ramnose ligado à molécula, não são absorvidos na porção do intestino delgado e, desta forma, conseguem atingir o intestino grosso, mais especificamente o cólon, em maior concentração, onde são hidrolisados pelas enzimas ramnosidases da microflora intestinal, e os metabólitos são absorvidos. Entretanto, no cólon, a área de troca e o sistema de transporte são reduzidos, o que torna mais lenta e menos eficiente a absorção dos flavonoides ligados a ramnose quando comparada aos demais flavonoides glicosilados (Manach *et al.*, 1995; Hollman e Katan, 1997). Estudos de Yokomizo e colaboradores (2005b) mostraram que o flavonoide miricitrina, assim como a quercetina glicosilada, parece não sofrer nenhum processo de degradação em condições experimentais que condizem com as características fisiológicas do estômago (pH ácido = 1,5). Entretanto, quando colocadas em pH correspondente ao pH intestinal (pH 8,5), há uma extensa degradação deste flavonoide. Desta forma, podemos sugerir que a miricitrina, por apresentar um açúcar do tipo ramnose, resiste à hidrólise ácida no estômago e, atinge a porção intestinal de forma intacta, onde passa a ser metabolizada pela ação da microflora intestinal, uma vez que, não foi possível detectar a miricitrina, na sua forma glicosilada, no plasma de roedores e nem mesmo, no cólon de camundongos após sua administração pela via oral.

Nesse contexto, o fato da miricitrina ter apresentado efeito anti-inflamatório e antinociceptivo no modelo de colite experimental após sua administração pela via oral, embora não tenha sido detectado no plasma dos animais após tratamento pela mesma via, sugere que a ação deste composto ocorra devido ao seu acúmulo no sangue e/ou nos tecidos alvos, ou, que a miricitrina seja metabolizada após sua administração, e os seus metabólitos formados, sejam os responsáveis pela atividade biológica observada.

Para responder esta questão foi realizado tratamento por 7 dias consecutivos com a miricitrina, uma vez ao dia com a dose 10 mg/kg e, amostras de sangue e de cólon foram coletadas e analisadas pelo sistema UPLC QTof, cujo analisador, é o mais adequado para a identificação e

quantificação dos metabólitos de um composto de referência, uma vez que estes equipamentos possuem diferentes softwares e bibliotecas de dados, os quais permitem identificar as diferenças existentes entre uma amostra e outra através de cálculos estatísticos, e sugerir, os possíveis metabólitos presentes em uma amostra para um determinado composto (Chiaradia, 2008).

Nossos resultados mostraram que, mesmo após 7 dias de tratamento, não foi possível detectar a miricitrina nem no plasma, nem no cólon dos camundongos tratados. Entretanto, os dados obtidos sugerem a presença dos metabólitos, sulfato de miricetina e 3,5-dihidroxifenilacético (3,5-DHPA) no plasma, e os ácidos fenólicos, 3-hidroxifenilacético (3-HPA) e 3,5-dihidroxifenilacético (3,5-DHPA) no cólon dos animais tratados. Sendo assim, é possível sugerir que os metabólitos formados após administração da miricitrina pela via oral, sejam realmente os responsáveis pelo efeito farmacológico observado no modelo da colite induzida pelo DSS. No entanto, para confirmar essa hipótese, bem como, para determinar se o efeito anti-inflamatório dos metabólitos originados a partir da administração oral da miricitrina, neste modelo experimental, é sistêmico ou local, estudos mais específicos devem ser realizados.

Os resultados do presente trabalho, corroboram com dados da literatura, os quais mostram que, os flavonoides apresentam baixa biodisponibilidade quando administrados pela via oral, devido a sua alta taxa de metabolização ou baixa absorção (Piskula e Terao, 1998; Crespy *et al.*, 1999; Piskula *et al.*, 1999; Scalbert *et al.*, 2002). Conforme descrito na literatura, o metabolismo dos polifenóis ocorre por uma via comum, ou seja, compostos glicosilados precisam ser hidrolizados pelas enzimas intestinais para que possam ser absorvidos e, durante o processo de absorção, estes compostos na forma aglicona são conjugados, principalmente com sulfato ou glucuronídeo (Scalbert e Williamson, 2000). Por esta razão, a forma aglicona não é detectada ou aparece na circulação sanguínea geralmente em baixas concentrações (Boersma *et al.*, 2002; Mullen *et al.*, 2008; Vissienon *et al.*, 2011). Além disso, inúmeros estudos *in vivo* e *in vitro*, têm mostrado que os flavonoides são extensivamente metabolizados pela microbiota intestinal, ocorrendo principalmente, a hidrólise das ligações glicosídicas e a fissão do anel propiônico, que levam a formação dos diferentes ácidos fenólicos, como por exemplo, os ácidos fenilacéticos (Day *et al.*, 2001; Sesink *et al.*, 2001; Aura *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Schoefer *et al.*, 2002; Natsume *et al.*, 2003; Schoefer *et al.*, 2003; Labib

et al., 2004; Keppler e Humpf, 2005; Ruiz *et al.*, 2007; Winter *et al.*, 2010).

Os ácidos fenólicos parecem ser formados a partir da ação dos microorganismos presentes na flora colônica. Estudos mostraram que os ácidos fenólicos possuem inúmeras propriedades farmacológicas, dentre elas, ação sobre o crescimento e proliferação celular (Franco *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004). Além disso, o ácido 3,4-dihidroxifenilacético demonstrou possuir atividade antiproliferativa em células cancerosas de cólon e próstata (Gao *et al.*, 2006). Estudos realizados em células HT29 mostraram que os ácidos 3-fenilpropiónico, 3-hidroxifenilacético e 3,4'-fenilpropiónico reduziram a expressão da COX-2 à concentrações fisiológicas (Karlsson *et al.*, 2005). Recentemente, estudos mostraram que os metabólitos dos flavonoides gerados a partir da ação da microflora colônica exercem atividade anti-inflamatória (Larrosa *et al.*, 2009) e anti-apoptótica (Krajka-Kuzniak *et al.*, 2008) *in vivo*. Desta forma, pode-se sugerir que os flavonoides sejam pró-drogas e necessitem ser biotransformados para exercerem suas ações farmacológicas. A ideia de que os flavonoides sejam pró-drogas foi primeiramente considerada por Kim e colaboradores (Kim *et al.*, 1998), os quais observaram que os metabólitos formados pela degradação da rutina e quercetina pelas bactérias intestinais *in vitro*, os ácidos 3,4-dihidroxifenilacético e 4-hidroxifenilacético, apresentavam atividade antiplaquetária mais eficiente que a molécula original. De forma semelhante, Vissienon e colaboradores (2011) mostraram que os flavonoides luteolina, kaempferol e miricetina, necessitam da atividade da microflora intestinal para exercerem sua atividade ansiolítica, uma vez que esta atividade não foi observada quando os mesmos foram administrados pela via intraperitoneal ou mesmo quando os animais foram pré-tratados com antibióticos.

Nesse sentido, estudos em camundongos, mostraram que a miricitrina apresenta efeito ansiolítico e antipsicótico (Fernandez *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2011). Desta forma, considerando que os possíveis metabólitos identificados no presente trabalho, os ácidos 3-HPA e 3,4-DHPA, apresentam inúmeras atividades biológicas, assim como, são capazes de permear a BHE (Gerhart *et al.*, 1997), sugere-se que o efeito ansiolítico e antipsicótico da miricitrina ocorra devido a ação destes metabólitos formados após sua metabolização. Porém, a ação da miricetina na sua forma conjugada (miricetina sulfatada), cujo metabólito foi encontrado no plasma dos camundongos, não pode ser descartada. Por outro lado, estudos mostraram que o flavonoide miricitrina, quando administrado pela via intraperitoneal, apresenta

atividade farmacológica em diferentes modelos experimentais *in vivo* (Meotti *et al.*, 2006a; Meotti *et al.*, 2006b), e, por esta razão, podemos sugerir também que, além dos metabólitos identificados no plasma dos camundongos, o flavonoide miricitrina, na sua forma original, também exerce ação farmacológica.

Portanto, a fim de determinar a forma ativa do flavonoide miricitrina, à correlação entre o seu perfil farmacocinético e sua ação antinociceptiva no modelo de dor induzida pela administração intraplantar de PMA nos camundongos foi avaliada. Para tanto os animais foram tratados com miricitrina por via intravenosa (3 mg/kg) e oral (30 mg/kg), e os dados da resposta farmacológica foram comparados à concentração plasmática da miricitrina, quando administrada pelas mesmas vias e doses.

Nossos resultados mostraram que a miricitrina, quando administrada tanto pela via oral, quanto pela via intravenosa, produziu efeito antinociceptivo por até 4h. De forma semelhante, Meotti e colaboradores (Meotti *et al.*, 2007b), observaram que a miricitrina, quando administrada pela via intraperitoneal, foi capaz de inibir a alodinia mecânica induzida pela injeção de CFA na pata dos camundongos por um período de até 4 horas após sua administração. Sendo assim, podemos inferir que, por apresentar efeito analgésico logo após indução da hiperalgesia, a miricitrina parece ser a forma ativa deste composto, e que o efeito observado por um período de até 4 horas, pode ser decorrente da sua ação na modulação de cascatas de sinalização as quais estão diretamente envolvidas na transdução do sinal doloroso.

Nesse contexto, estudos de Souza e colaboradores (2002) mostraram que a ativação da via da PKC em tecido periférico leva ao desenvolvimento da resposta nociceptiva espontânea, sugerindo que a ativação da PKC *in vivo*, é essencial para o estabelecimento da resposta nociceptiva induzida. Além disso, estudos de Ferreira e colaboradores (2005) mostraram que a administração i.pl. de PMA induz a ativação de duas isoformas de PKC, a PKC α e a PKC ϵ . Ademais, estudos mostram que a via da PKC esta diretamente envolvida na ativação da cascata inflamatória (Lallena *et al.*, 1999; Toton *et al.*, 2011). Desta forma, considerando que a miricitrina apresenta atividade inibitória sobre a via da PKC, conforme demonstrado neste trabalho, podemos sugerir que a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da miricitrina, ocorram pela inibição dessa via de sinalização a partir da administração deste flavonoide pela via intravenosa, e que, uma vez inibida, esta possa atuar por um período de até 4 horas.

Entretanto, conforme descrito anteriormente, a análise do perfil farmacocinético da miricitrina mostrou que quando administrado pela via intravenosa, este composto não é mais detectado no plasma a partir de 1h. Além disso, com base na análise dos seus parâmetros farmacocinéticos, quando administrada por esta mesma via, foi observado que esta molécula apresenta um baixo tempo de meia vida e baixo clearance, sugerindo que a miricitrina seja rapidamente deglicosilada e/ou metabolizada após sua administração, e que, os metabólitos formados, sejam também responsáveis por suas ações farmacológicas.

Esta hipótese é reforçada pelos resultados apresentados neste trabalho, os quais mostraram que a miricitrina embora tenha apresentado ação antinociceptiva e anti-inflamatória quando administrada pela via oral, não foi detectada no plasma e cólon dos animais tratados. Dessa forma, é possível sugerir, conforme já aventado para outros flavonoides como o kaempferol e a quercetina (Vissienon *et al.*, 2011), que a miricitrina é uma pró-droga, e desta forma, os metabólitos identificados sejam os responsáveis pela sua atividade farmacológica no modelo de colite experimental.

Por fim, considerando que a forma aglicona conjugada ao grupo sulfato foi identificada no plasma dos animais após administração da miricitrina pela via oral, é possível sugerir que a miricitrina sofreu processo de deglicosilação no cólon dos animais para formação da molécula aglicona, assim como de fato, é demonstrado para a maioria dos flavonoides glicosilado que são administrados pela via oral (Manach *et al.*, 2004; Manach *et al.*, 2005). De fato, essa hipótese corrobora com os dados *in vitro* obtidos no presente trabalho, os quais mostraram que a forma aglicona foi capaz de reduzir os níveis da citocina TNF- α nas células de macrófagos. O fato de não termos identificado a molécula aglicona no cólon e no sangue dos animais pode ser explicado, pelo menos em parte, pelo fato de a coleta das amostras de plasma e cólon ter sido realizada em apenas um único tempo após a administração da última dose de miricitrina (após sete dias de tratamento) pela via oral. Portanto, para confirmar essa hipótese, estudos adicionais, em diferentes tempos de coleta, devem ser realizados.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que o flavonoide miricitrina foi efetivo em prevenir a colite experimental induzida pelo DSS em camundongos através da inibição da infiltração de células inflamatórias para o cólon inflamado, da redução da produção e/ou expressão de mediadores inflamatórios no tecido colônico e modulação de importantes vias de sinalização, as quais estão amplamente

relacionadas ao desenvolvimento das IBDs, tais como, PKC ϵ /MAPKs/NF- κ B-p65 (ver esquema proposto na **figura 33**). Ademais, o presente trabalho demonstrou que o flavonoide miricitrina foi capaz de prevenir a dor visceral induzida pela colite experimental. Adicionalmente, os resultados do presente trabalho nos permitem sugerir que tanto a forma glicosilada da miricitrina, como a forma aglicona, bem como os seus metabólitos formados, podem representar a forma ativa deste flavonoide, e desta forma, contribuem para sua ação farmacológica. As **figuras 34 e 35** representam a possível correlação entre o perfil farmacocinético e a atividade farmacológica da miricitrina após sua administração intravenosa e oral.

Em conjunto, estes resultados sugerem que a miricitrina ou um composto análogo pode representar um candidato promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos para a terapia das IBDs. Além disso, os resultados da análise do perfil farmacocinético da miricitrina ajudam na melhor compreensão da sua atividade farmacológica, bem como, permitem sugerir a forma ativa deste flavonoide.

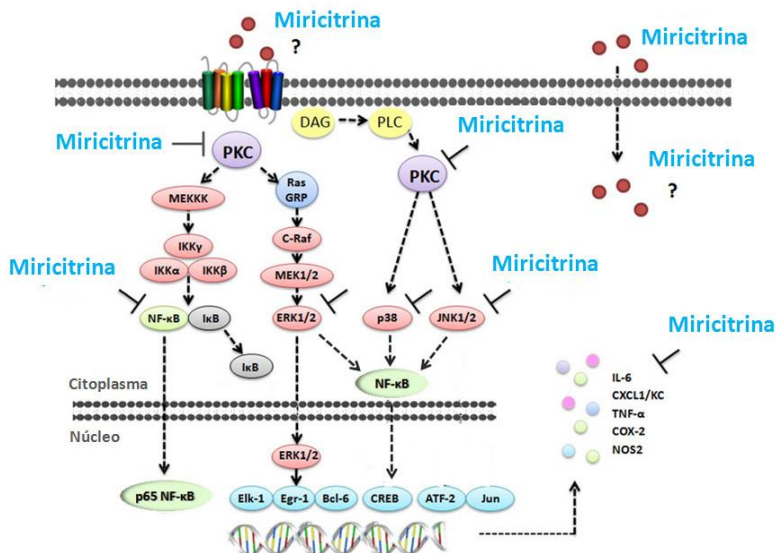


Figure 33. Representação esquemática do mecanismo pelo qual a miricitrina regula a fisiopatologia no modelo de colite induzida pelo DSS em camundongos. O pré-tratamento oral com miricitrina no modelo de colite experimental induzido pelo DSS, reduz os níveis e/ou a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como IL-6, CXCL1/KC e TNF- α , assim como inibe a expressão de enzimas inflamatórias como a NOS2 e COX-2, através da modulação das vias de sinalização PKC ϵ /MAPKs/NF- κ B-p65 no tecido colônico dos animais. PKC, proteína quinase C; DAG, diacilglicerol; PLC, fosfolipase C; MEKKK, mitogen activated protein kinase kinase kinases; ERK1/2, quinase regulada por sinal extracelular; p-38, quinase p-38; JNK1/2, quinase c-jun-N-terminal; IKK, quinase IkappaB; NF- κ B, fator nuclear kappaB; IL, interleucina; TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; CXCL1/KC, quimiocina derivada de queratinócito; COX-2, ciclooxigenase-2; NOS2, óxido nítrico sintase 2. (\downarrow), inibição; (\rightarrow), estimulação.

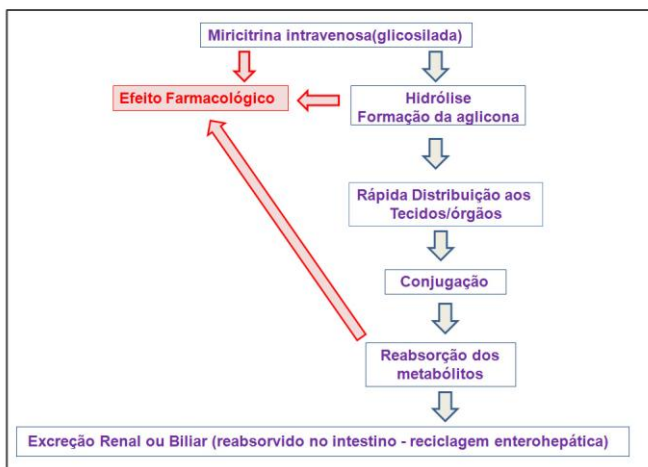


Figura 34. Correlação entre a atividade farmacológica e o perfil farmacocinético da miricitrina após sua administração pela via intravenosa.

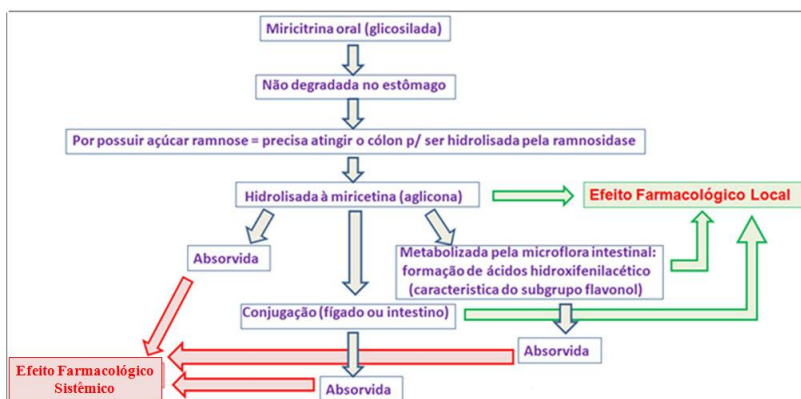


Figura 35. Correlação entre a atividade farmacológica e o perfil farmacocinético da miricitrina após sua administração pela via oral.

7. CONCLUSÕES

O presente estudo buscou avaliar a possível atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da miricitrina no modelo de colite experimental induzido pelo DSS, em camundongos. De acordo com os resultados apresentados, a miricitrina reduziu os parâmetros inflamatórios avaliados nos animais com colite experimental, caracterizados principalmente pela diminuição dos danos macro e microscópicos no cólon dos animais. Ademais, buscamos determinar os possíveis mecanismos pelos quais a miricitrina exerce estas ações. Os resultados sugerem que a inibição da inflamação, induzida pela miricitrina no modelo DSS, está associada com o bloqueio da migração de células inflamatórias e à redução dos níveis de produção e/ou expressão de citocinas, quimiocinas e enzimas inflamatórias as quais são responsáveis pela ativação e perpetuação do processo inflamatório. Além disso, a miricitrina inibe importantes vias inflamatórias, como as vias da PKC/MAPKs/NF- κ B.

Adicionalmente, foram desenvolvidos e validados, os métodos analíticos para a quantificação da miricitrina em plasma de camundongo e rato, através do sistema HPLC-MS e HPLC-MS/MS, respectivamente. O perfil farmacocinético da miricitrina em plasma de camundongos sugere que o composto seja amplamente degradado e/ou conjugado a proteínas plasmáticas, enquanto que, o perfil farmacocinético deste composto, determinado em plasma de rato, sugere que o mesmo seja rapidamente eliminado do sangue e transferido para os tecidos, onde é metabolizado. As análises das amostras de plasma e cólon após o tratamento com miricitrina por via oral durante sete dias consecutivos sugerem a presença de metabólitos formados através da hidrólise da porção glicosilada da miricitrina, para formação da molécula aglicona, a qual é conjugada com grupo sulfato, e através da cisão no anel C da aglicona, para formação dos ácidos fenólicos. Assim, tanto a forma glicosilada da miricitrina, como os seus metabólitos formados, parecem estar envolvidos nas suas ações farmacológicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agoff, S. N., Brentnall, T. A., Crispin, D. A., Taylor, S. L., Raaka, S., Haggitt, R. C., Reed, M. W., Afonina, I. A., Rabinovitch, P. S., Stevens, A. C., Feng, Z. e Bronner, M. P. The role of cyclooxygenase 2 in ulcerative colitis-associated neoplasia. Am J Pathol, v.157, n.3, Sep, p.737-45. 2000.

Agrawal, P. K. Studies in organic chemistry. New York: Elsevier Science Publishers. 1989.

Agullo, G., Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Viala, C., Remesy, C., Chap, H. e Payrastre, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. Biochem Pharmacol, v.53, n.11, Jun 1, p.1649-57. 1997.

Aharoni, R., Kayhan, B., Brenner, O., Domev, H., Labunskay, G. e Arnon, R. Immunomodulatory therapeutic effect of glatiramer acetate on several murine models of inflammatory bowel disease. J Pharmacol Exp Ther, v.318, n.1, Jul, p.68-78. 2006.

Alavijeh, M. S. e Palmer, A. M. The pivotal role of drug metabolism and pharmacokinetics in the discovery and development of new medicines. IDrugs, v.7, n.8, Aug, p.755-63. 2004.

Ali, A. S., Ali, S., El-Rayes, B. F., Philip, P. A. e Sarkar, F. H. Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy. Cancer Treat Rev, v.35, n.1, Feb, p.1-8. 2009.

Ardrey, R. E. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. Huddersfield: Wiley. 2003

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S. e Neurath, M. F. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. Nat Med, v.6, n.5, May, p.583-8. 2000.

Atreya, R. e Neurath, M. F. Involvement of IL-6 in the pathogenesis of inflammatory bowel disease and colon cancer. Clin Rev Allergy Immunol, v.28, n.3, Jun, p.187-96. 2005.

Aura, A. M., O'leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimia, R., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey, K. M. e Poutanen, K. Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. J Agric Food Chem, v.50, n.6, Mar 13, p.1725-30. 2002.

Balendran, A., Hare, G. R., Kieloch, A., Williams, M. R. e Alessi, D. R. Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. FEBS Lett, v.484, n.3, Nov 10, p.217-23. 2000.

Banchereau, J. e Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, v.392, n.6673, Mar 19, p.245-52. 1998.

Barker, J. N., Jones, M. L., Swenson, C. L., Sarma, V., Mitra, R. S., Ward, P. A., Johnson, K. J., Fantone, J. C., Dixit, V. M. e Nickoloff, B. J. Monocyte chemotaxis and activating factor production by keratinocytes in response to IFN-gamma. J Immunol, v.146, n.4, Feb 15, p.1192-7. 1991.

Barnes, P. J. Nuclear factor-kappa B. Int J Biochem Cell Biol, v.29, n.6, Jun, p.867-70. 1997.

Baumgart, D. C. e Carding, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. Lancet, v.369, n.9573, May 12, p.1627-40. 2007b.

Baumgart, D. C. e Sandborn, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. Lancet, v.369, n.9573, May 12, p.1641-57. 2007a.

Bento, A. F. Mediadores químicos e resposta celular na colite induzida pelo DSS: papel dos mediadores lipídicos derivados do omega-3 na resolução da colite experimental. Tese de doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de

Graduação em Farmacologia. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. 2012.

Bento, A. F., Leite, D. F., Claudino, R. F., Hara, D. B., Leal, P. C. e Calixto, J. B. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. J Leukoc Biol, v.84, n.4, Oct, p.1213-21. 2008.

Bento, A. F., Marcon, R., Dutra, R. C., Claudino, R. F., Cola, M., Leite, D. F. e Calixto, J. B. beta-Caryophyllene inhibits dextran sulfate sodium-induced colitis in mice through CB2 receptor activation and PPARgamma pathway. Am J Pathol, v.178, n.3, Mar, p.1153-66. 2011a.

Bernstein, C. N., Niazi, N., Robert, M., Mertz, H., Kodner, A., Munakata, J., Naliboff, B. e Mayer, E. A. Rectal afferent function in patients with inflammatory and functional intestinal disorders. Pain, v.66, n.2-3, Aug, p.151-61. 1996.

Bernstein, C. N. e Shanahan, F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. Gut, v.57, n.9, Sep, p.1185-91. 2008.

Bielefeldt, K., Davis, B. e Binion, D. G. Pain and inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis, v.15, n.5, May, p.778-88. 2009.

Boersma, M. G., Van Der Woude, H., Bogaards, J., Boeren, S., Vervoort, J., Cnubben, N. H., Van Iersel, M. L., Van Bladeren, P. J. e Rietjens, I. M. Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. Chem Res Toxicol, v.15, n.5, May, p.662-70. 2002.

Bonen, D. K. e Cho, J. H. The genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.124, n.2, Feb, p.521-36. 2003.

Bosani, M., Ardizzone, S. e Porro, G. B. Biologic targeting in the treatment of inflammatory bowel diseases. Biologics, v.3, p.77-97. 2009.

Boughton-Smith, N. K., Evans, S. M., Hawkey, C. J., Cole, A. T., Balsitis, M., Whittle, B. J. e Moncada, S. Nitric oxide synthase activity

in ulcerative colitis and Crohn's disease. Lancet, v.342, n.8867, Aug 7, p.338-40. 1993.

Boyko, E. J., Perera, D. R., Koepsell, T. D., Keane, E. M. e Inui, T. S. Effects of cigarette smoking on the clinical course of ulcerative colitis. Scand J Gastroenterol, v.23, n.9, Nov, p.1147-52. 1988.

Braegger, C. P., Nicholls, S., Murch, S. H., Stephens, S. e Macdonald, T. T. Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. Lancet, v.339, n.8785, Jan 11, p.89-91. 1992.

Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Agência Nacioanal de Vigilância Sanitária, Resolução RE n. 899, 29 de maio de 2003 – Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. 2003.

Breese, E. J., Michie, C. A., Nicholls, S. W., Murch, S. H., Williams, C. B., Domizio, P., Walker-Smith, J. A. e Macdonald, T. T. Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.106, n.6, Jun, p.1455-66. 1994.

Briscoe, C. J. e Hage, D. S. Factors affecting the stability of drugs and drug metabolites in biological matrices. Bioanalysis, v.1, n.1, Apr, p.205-20. 2009.

Brito, N. M., Amarante Júnior O. P., Posele L., Ribeiro M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Ver. Ecotoxicol. Meio Amb., v.13, p.126-146. 2003.

Broom, O. J., Widjaya, B., Troelsen, J., Olsen, J. e Nielsen, O. H. Mitogen activated protein kinases: a role in inflammatory bowel disease? Clin Exp Immunol, v.158, n.3, Dec, p.272-80. 2009.

Brown, J. E., Khodr, H., Hider, R. C. e Rice-Evans, C. A. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: implications for their antioxidant properties. Biochem J, v.330 (Pt 3), Mar 15, p.1173-8. 1998.

Bruno, O., Brullo, C., Arduino, N., Schenone, S., Ranise, A., Bondavalli, F., Ottonello, L., Dapino, P. e Dallegrì, F. Synthesis and

biological evaluation of neutrophilic inflammation inhibitors. Farmaco, v.59, n.3, Mar, p.223-35. 2004.

Buane, P., Di Carlo, E., Caputi, L., Brandolini, L., Mosca, M., Cattani, F., Pellegrini, L., Biordi, L., Coletti, G., Sorrentino, C., Fedele, G., Colotta, F., Melillo, G. e Bertini, R. Crucial pathophysiological role of CXCR2 in experimental ulcerative colitis in mice. J Leukoc Biol, v.82, n.5, Nov, p.1239-46. 2007.

Budarf, M. L., Labbe, C., David, G. e Rioux, J. D. GWA studies: rewriting the story of IBD. Trends Genet, v.25, n.3, Mar, p.137-46. 2009.

Budha, N. R., Lee, R. E. e Meibohm, B. Biopharmaceutics, pharmacokinetics and pharmacodynamics of antituberculosis drugs. Curr Med Chem, v.15, n.8, p.809-25. 2008.

Cadwell, K., Liu, J. Y., Brown, S. L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J. K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J. A., Hunt, S., Stone, C. D., Brunt, E. M., Xavier, R. J., Sleckman, B. P., Li, E., Mizushima, N., Stappenbeck, T. S. e Virgin, H. W. T. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells. Nature, v.456, n.7219, Nov 13, p.259-63. 2008.

Cai, H., Smola, U., Wixler, V., Eisenmann-Tappe, I., Diaz-Meco, M. T., Moscat, J., Rapp, U. e Cooper, G. M. Role of diacylglycerol-regulated protein kinase C isoforms in growth factor activation of the Raf-1 protein kinase. Mol Cell Biol, v.17, n.2, Feb, p.732-41. 1997.

Calixto, J. B., Campos, M. M., Otuki, M. F. e Santos, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. Planta Med, v.70, n.2, Feb, p.93-103. 2004.

Calixto, J. B., Otuki, M. F. e Santos, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappaB). Planta Med, v.69, n.11, Nov, p.973-83. 2003.

Campbell, K. J. e Perkins, N. D. Regulation of NF-kappaB function. Biochem Soc Symp, n.73, p.165-80. 2006.

Camuesco, D., Comalada, M., Rodriguez-Cabezas, M. E., Nieto, A., Lorente, M. D., Concha, A., Zarzuelo, A. e Galvez, J. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. Br J Pharmacol, v.143, n.7, Dec, p.908-18. 2004.

Carter, A. B. e Hunninghake, G. W. A constitutive active MEK --> ERK pathway negatively regulates NF-kappa B-dependent gene expression by modulating TATA-binding protein phosphorylation. J Biol Chem, v.275, n.36, Sep 8, p.27858-64. 2000.

Carter, A. B., Knudtson, K. L., Monick, M. M. e Hunninghake, G. W. The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF-kappaB-dependent gene expression. The role of TATA-binding protein (TBP). J Biol Chem, v.274, n.43, Oct 22, p.30858-63. 1999.

Cass, Q. B., & Degani, A. L. G. Desenvolvimento de métodos por HPLC. Fundamentos, Estratégias, Validação São Carlos: Edufscar. 2001

Cassiano, N. M., J. C. Barreiro, L. R. R. Martins, V. Oliveira E Q. B. Cass. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. Quim. Nova, v.32, No. 4, 1021-1030. 2009.

Cervero, F. Mechanisms of acute visceral pain. Br Med Bull, v.47, n.3, Jul, p.549-60. 1991.

Cervero, F. e Janig, W. Visceral nociceptors: a new world order? Trends Neurosci, v.15, n.10, Oct, p.374-8. 1992.

Cervero, F. e Laird, J. M. Visceral pain. Lancet, v.353, n.9170, Jun 19, p.2145-8. 1999.

Chang, L., Munakata, J., Mayer, E. A., Schmulson, M. J., Johnson, T. D., Bernstein, C. N., Saba, L., Naliboff, B., Anton, P. A. e Matin, K. Perceptual responses in patients with inflammatory and functional bowel disease. Gut, v.47, n.4, Oct, p.497-505. 2000a.

Chapman, C. R. e Gavrin, J. Suffering: the contributions of persistent pain. Lancet, v.353, n.9171, Jun 26, p.2233-7. 1999.

Chen, G. Y., Shaw, M. H., Redondo, G. e Nunez, G. The innate immune receptor Nod1 protects the intestine from inflammation-induced tumorigenesis. Cancer Res, v.68, n.24, Dec 15, p.10060-7. 2008.

Chen, J. e Hsieh, Y. Stabilizing drug molecules in biological samples. Ther Drug Monit, v.27, n.5, Oct, p.617-24. 2005.

Chen, Y., Yang, L. e Lee, T. J. Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation. Biochem Pharmacol, v.59, n.11, Jun 1, p.1445-57. 2000.

Chen, Z., Ying, X., Meng, S., Zhu, X., Jiang, H., Cao, Q., Li, X. e Meng, F. High-performance liquid chromatographic determination and pharmacokinetic study of apigenin-7-O-beta-D-glucoside in rat plasma after intravenous administration. Arch Pharm Res, v.34, n.5, May, p.741-6. 2011.

Chiaradia, M. C., C. H. Collins; I. C. S. F. Jardim. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. Quim. Nova, v.vol.31 no.3. 2008.

Chintakuntlawar, A. V. e Chodosh, J. Chemokine CXCL1/KC and its receptor CXCR2 are responsible for neutrophil chemotaxis in adenoviral keratitis. J Interferon Cytokine Res, v.29, n.10, Oct, p.657-66. 2009.

Clapper, M. L., Cooper, H. S. e Chang, W. C. Dextran sulfate sodium-induced colitis-associated neoplasia: a promising model for the development of chemopreventive interventions. Acta Pharmacol Sin, v.28, n.9, Sep, p.1450-9. 2007.

Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Galvez, J. e Zarzuelo, A. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. Eur J Immunol, v.35, n.2, Feb, p.584-92. 2005.

Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S. e Sedergran, D. J. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. Lab Invest, v.69, n.2, Aug, p.238-49. 1993.

Cordova, M. M., Werner, M. F., Silva, M. D., Ruani, A. P., Pizzolatti, M. G. e Santos, A. R. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. Neurosci Lett, v.495, n.3, May 20, p.173-7. 2011.

Cosnes, J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. Best Pract Res Clin Gastroenterol, v.18, n.3, Jun, p.481-96. 2004.

Cottone, M., Rosselli, M., Orlando, A., Oliva, L., Puleo, A., Cappello, M., Traina, M., Tonelli, F. e Pagliaro, L. Smoking habits and recurrence in Crohn's disease. Gastroenterology, v.106, n.3, Mar, p.643-8. 1994.

Crespy, V., Morand, C., Manach, C., Besson, C., Demigne, C. e Remesy, C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. Am J Physiol, v.277, n.1 Pt 1, Jul, p.G120-6. 1999.

Cruz, T., Galvez, J., Crespo, E., Ocete, M. A. e Zarzuelo, A. Effects of silymarin on the acute stage of the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. Planta Med, v.67, n.1, Feb, p.94-6. 2001.

Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Schivo, I. R., Napimoga, M. H., Parada, C. A., Poole, S., Teixeira, M. M., Ferreira, S. H. e Cunha, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. J Leukoc Biol, v.83, n.4, Apr, p.824-32. 2008.

D'archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C. e Masella, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanita, v.43, n.4, p.348-61. 2007.

D'esposito, F., Tattam, B. N., Ramzan, I. e Murray, M. A liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry (LC-MS/MS) assay for the determination of irinotecan (CPT-11) and its two major metabolites in human liver microsomal incubations and human plasma samples. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.875, n.2, Nov 15, p.522-30. 2008.

Dams, R., Benijts, T., Gunther, W., Lambert, W. e De Leenheer, A. Influence of the eluent composition on the ionization efficiency for

morphine of pneumatically assisted electrospray, atmospheric-pressure chemical ionization and sonic spray. Rapid Commun Mass Spectrom, v.16, n.11, p.1072-7. 2002.

Day, A. J., Mellon, F., Barron, D., Sarrazin, G., Morgan, M. R. e Williamson, G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. Free Radic Res, v.35, n.6, Dec, p.941-52. 2001.

Degani, A. L. G., Cass, Q. B., Vieira, P. C. . Cromatografia: um breve ensaio. Quim. Nova, v.7, p.21-27. 1997.

Dieleman, L. A., Ridwan, B. U., Tennyson, G. S., Beagley, K. W., Bucy, R. P. e Elson, C. O. Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. Gastroenterology, v.107, n.6, Dec, p.1643-52. 1994.

Dutra, R. C., Claudino, R. F., Bento, A. F., Marcon, R., Schmidt, E. C., Bouzon, Z. L., Pianowski, L. F. e Calixto, J. B. Preventive and therapeutic euphol treatment attenuates experimental colitis in mice. PLoS One, v.6, n.11, p.e27122. 2011b.

Edenharder, R. e Grunhage, D. Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumene hydroperoxide in Salmonella typhimurium TA102. Mutat Res, v.540, n.1, Sep 9, p.1-18. 2003.

Ellis, R. D., Goodlad, J. R., Limb, G. A., Powell, J. J., Thompson, R. P. e PUNCHARD, N. A. Activation of nuclear factor kappa B in Crohn's disease. Inflamm Res, v.47, n.11, Nov, p.440-5. 1998.

Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S. e Riddell, R. H. Experimental models of inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.109, n.4, Oct, p.1344-67. 1995.

Eriksson, T. e Bjorkman, S. Handling of blood samples for determination of thalidomide. Clin Chem, v.43, n.6 Pt 1, Jun, p.1094-6. 1997.

F.D.A. FDA, United States Food and Drug Administration (US-FDA), Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary

Medicine, Department of Health and Human Services. Guidance for industry, Bioanalytical Method Validation 2001.

Fernandez, S. P., Nguyen, M., Yow, T. T., Chu, C., Johnston, G. A., Hanrahan, J. R. e Chebib, M. The flavonoid glycosides, myricitrin, gossypin and naringin exert anxiolytic action in mice. Neurochem Res, v.34, n.10, Oct, p.1867-75. 2009.

Ferreira, J., Triches, K. M., Medeiros, R. e Calixto, J. B. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. Pain, v.117, n.1-2, Sep, p.171-81. 2005.

Franco, J. L., Posser, T., Missau, F., Pizzolatti, M. G., Dos Santos, A. R., Souza, D. O., Aschner, M., Rocha, J. B., Dafre, A. L. e Farina, M. Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction. Environ Toxicol Pharmacol, v.30, n.3, Nov 1, p.272-278. 2010.

Franco, O. E., Onishi, T., Umeda, Y., Soga, N., Wakita, T., Arima, K., Yanagawa, M. e Sugimura, Y. Phenylacetate inhibits growth and modulates cell cycle gene expression in renal cancer cell lines. Anticancer Res, v.23, n.2B, Mar-Apr, p.1637-42. 2003.

Frank, D. N., Robertson, C. E., Hamm, C. M., Kpadeh, Z., Zhang, T., Chen, H., Zhu, W., Sartor, R. B., Boedeker, E. C., Harpaz, N., Pace, N. R. e Li, E. Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. Inflamm Bowel Dis, v.17, n.1, Jan, p.179-84. 2011.

Frostad, A. B. The treatment of seasonal allergic rhinitis with a 2% aqueous solution of sodium cromoglycate delivered by a metered dose nasal spray. Clin Allergy, v.7, n.4, Jul, p.347-53. 1977.

Fura, A., Harper, T. W., Zhang, H., Fung, L. e Shyu, W. C. Shift in pH of biological fluids during storage and processing: effect on bioanalysis. J Pharm Biomed Anal, v.32, n.3, Jul 14, p.513-22. 2003.

Fuss, I. J., Neurath, M., Boirivant, M., Klein, J. S., De La Motte, C., Strong, S. A., Fiocchi, C. e Strober, W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma,

whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. J Immunol, v.157, n.3, Aug 1, p.1261-70. 1996.

Galvez, J., Coelho, G., Crespo, M. E., Cruz, T., Rodriguez-Cabezas, M. E., Concha, A., Gonzalez, M. e Zarzuelo, A. Intestinal anti-inflammatory activity of morin on chronic experimental colitis in the rat. Aliment Pharmacol Ther, v.15, n.12, Dec, p.2027-39. 2001.

Gamet-Payrastre, L., Manenti, S., Gratacap, M. P., Tulliez, J., Chap, H. e Payrastre, B. Flavonoids and the inhibition of PKC and PI 3-kinase. Gen Pharmacol, v.32, n.3, Mar, p.279-86. 1999.

Gao, K., Xu, A., Krul, C., Venema, K., Liu, Y., Niu, Y., Lu, J., Bensoussan, L., Seeram, N. P., Heber, D. e Henning, S. M. Of the major phenolic acids formed during human microbial fermentation of tea, citrus, and soy flavonoid supplements, only 3,4-dihydroxyphenylacetic acid has antiproliferative activity. J Nutr, v.136, n.1, Jan, p.52-7. 2006.

Gao, S., Zhang, Z. P. e Karnes, H. T. Sensitivity enhancement in liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry using derivatization and mobile phase additives. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, v.825, n.2, Oct 25, p.98-110. 2005.

Garrett, W. S., Gordon, J. I. e Glimcher, L. H. Homeostasis and inflammation in the intestine. Cell, v.140, n.6, Mar 19, p.859-70. 2010.

Gebhart, G. F. Pathobiology of visceral pain: molecular mechanisms and therapeutic implications IV. Visceral afferent contributions to the pathobiology of visceral pain. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.278, n.6, Jun, p.G834-8. 2000.

Gee, J. M., Dupont, M. S., Rhodes, M. J. e Johnson, I. T. Quercetin glucosides interact with the intestinal glucose transport pathway. Free Radic Biol Med, v.25, n.1, Jul 1, p.19-25. 1998.

Gent, A. E., Hellier, M. D., Grace, R. H., Swarbrick, E. T. e Coggon, D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. Lancet, v.343, n.8900, Mar 26, p.766-7. 1994.

Gerhart, D. Z., Enerson, B. E., Zhdankina, O. Y., Leino, R. L. e Drewes, L. R. Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain

endothelium and glia in adult and suckling rats. Am J Physiol, v.273, n.1 Pt 1, Jul, p.E207-13. 1997.

Gersemann, M., Wehkamp, J. e Stange, E. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. J Intern Med, Dec 30. 2011.

Ghia, J. E., Blennerhassett, P. e Collins, S. M. Impaired parasympathetic function increases susceptibility to inflammatory bowel disease in a mouse model of depression. J Clin Invest, v.118, n.6, Jun, p.2209-18. 2008.

Glocker, E. O., Kotlarz, D., Boztug, K., Gertz, E. M., Schaffer, A. A., Noyan, F., Perro, M., Diestelhorst, J., Allroth, A., Murugan, D., Hatscher, N., Pfeifer, D., Sykora, K. W., Sauer, M., Kreipe, H., Lacher, M., Nustede, R., Woellner, C., Baumann, U., Salzer, U., Koletzko, S., Shah, N., Segal, A. W., Sauerbrey, A., Buderus, S., Snapper, S. B., Grimbacher, B. e Klein, C. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. N Engl J Med, v.361, n.21, Nov 19, p.2033-45. 2009.

Gombar, V. K., Silver, I. S. e Zhao, Z. Role of ADME characteristics in drug discovery and their in silico evaluation: in silico screening of chemicals for their metabolic stability. Curr Top Med Chem, v.3, n.11, p.1205-25. 2003.

Graefe, E. U., Wittig, J., Mueller, S., Riethling, A. K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobasch, G., Derendorf, H. e Veit, M. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. J Clin Pharmacol, v.41, n.5, May, p.492-9. 2001.

Green, J. M. A. A practical guide to analytical method validation. Analytical Chemistry, v.68, p.305-309. 1996.

Greenhough, A., Smartt, H. J., Moore, A. E., Roberts, H. R., Williams, A. C., Paraskeva, C. e Kaidi, A. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. Carcinogenesis, v.30, n.3, Mar, p.377-86. 2009.

Griffis, C. A., Compton, P. e Doering, L. The effect of pain on leukocyte cellular adhesion molecules. Biol Res Nurs, v.7, n.4, Apr, p.297-312. 2006.

- Griner, E. M. e Kazanietz, M. G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. Nat Rev Cancer, v.7, n.4, Apr, p.281-94. 2007.
- Grisham, M. B., Specian, R. D. e Zimmerman, T. E. Effects of nitric oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in a model of chronic granulomatous colitis. J Pharmacol Exp Ther, v.271, n.2, Nov, p.1114-21. 1994.
- Gross, V., Andus, T., Leser, H. G., Roth, M. e Scholmerich, J. Inflammatory mediators in chronic inflammatory bowel diseases. Klin Wochenschr, v.69, n.21-23, Dec 15, p.981-7. 1991.
- Guo, J., Meng, F., Ren, Z. e Zhao, Y. Pharmacokinetics and tissue distribution of a water-soluble flavonol triglycoside, CTN986, in mice. Planta Med, v.74, n.3, Feb, p.228-32. 2008.
- Haenen, G. R., Paquay, J. B., Korthouwer, R. E. e Bast, A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. Biochem Biophys Res Commun, v.236, n.3, Jul 30, p.591-3. 1997.
- Halliwell, B. e Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol, v.186, p.1-85. 1990.
- Halme, L., Paavola-Sakki, P., Turunen, U., Lappalainen, M., Farkkila, M. e Kontula, K. Family and twin studies in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol, v.12, n.23, Jun 21, p.3668-72. 2006.
- Hampe, J., Heymann, K., Krawczak, M. e Schreiber, S. Association of inflammatory bowel disease with indicators for childhood antigen and infection exposure. Int J Colorectal Dis, v.18, n.5, Sep, p.413-7. 2003.
- Hanauer, S. B. e Present, D. H. The state of the art in the management of inflammatory bowel disease. Rev Gastroenterol Disord, v.3, n.2, Spring, p.81-92. 2003.
- Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacol Ther, v.96, n.2-3, Nov-Dec, p.67-202. 2002.

Hayden, M. S. e Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. Cell, v.132, n.3, Feb 8, p.344-62. 2008.

Hayden, M. S., West, A. P. e Ghosh, S. NF-kappaB and the immune response. Oncogene, v.25, n.51, Oct 30, p.6758-80. 2006.

Hendel, J. e Nielsen, O. H. Expression of cyclooxygenase-2 mRNA in active inflammatory bowel disease. Am J Gastroenterol, v.92, n.7, Jul, p.1170-3. 1997.

Hibi, T., Ogata, H. e Sakuraba, A. Animal models of inflammatory bowel disease. J Gastroenterol, v.37, n.6, p.409-17. 2002.

Hollman, P. C. e Katan, M. B. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. Biomed Pharmacother, v.51, n.8, p.305-10. 1997.

Hommes, D., Van Den Blink, B., Plasse, T., Bartelsman, J., Xu, C., Macpherson, B., Tytgat, G., Peppelenbosch, M. e Van Deventer, S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. Gastroenterology, v.122, n.1, Jan, p.7-14. 2002.

Hong, T., Jin, G. B., Cho, S. e Cyong, J. C. Evaluation of the anti-inflammatory effect of baicalein on dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. Planta Med, v.68, n.3, Mar, p.268-71. 2002.

Hug, C. C., Jr. Pharmacokinetics of drugs administered intravenously. Anesth Analg, v.57, n.6, Nov-Dec, p.704-23. 1978.

Hugot, J. P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J. P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'morain, C. A., Gassull, M., Binder, V., Finkel, Y., Cortot, A., Modigliani, R., Laurent-Puig, P., Gower-Rousseau, C., Macry, J., Colombel, J. F., Sahbatou, M. e Thomas, G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. Nature, v.411, n.6837, May 31, p.599-603. 2001.

Hundorfean, G., Neurath, M. F. e Mudter, J. Functional relevance of T helper 17 (Th17) cells and the IL-17 cytokine family in inflammatory bowel disease. Inflamm Bowel Dis, v.18, n.1, Jan, p.180-6. 2012.

Hursel, R. e Westerterp-Plantenga, M. S. Consumption of milk-protein combined with green tea modulates diet-induced thermogenesis. Nutrients, v.3, n.8, Aug, p.725-33.

I.C.H. , International Conference on Harmonization, Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology. Q2A. (CPM/ICH/381/95). 1995.

Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L. e Nunez, G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. J Biol Chem, v.278, n.8, Feb 21, p.5509-12. 2003.

Ito, H., Takazoe, M., Fukuda, Y., Hibi, T., Kusugami, K., Andoh, A., Matsumoto, T., Yamamura, T., Azuma, J., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Shimoyama, T. e Kishimoto, T. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. Gastroenterology, v.126, n.4, Apr, p.989-96; discussion 947. 2004.

Iwasaki, A. e Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol, v.5, n.10, Oct, p.987-95. 2004.

Jaken, S. Protein kinase C isozymes and substrates. Curr Opin Cell Biol, v.8, n.2, Apr, p.168-73. 1996.

James, S. P. e Klapproth, J. M. Major pathways of mucosal immunity and inflammation: cell activation, cytokine production and the role of bacterial factors. Aliment Pharmacol Ther, v.10 Suppl 2, p.1-9. 1996.

Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A. e Sartor, R. B. Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity. J Immunol, v.163, n.6, Sep 15, p.3474-83. 1999.

Jurjus, A. R., Khoury, N. N. e Reimund, J. M. Animal models of inflammatory bowel disease. J Pharmacol Toxicol Methods, v.50, n.2, Sep-Oct, p.81-92. 2004.

Kaminska, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. Biochim Biophys Acta, v.1754, n.1-2, Dec 30, p.253-62. 2005.

Kang, H. E., Jung, H. Y., Cho, Y. K., Kim, S. H., Sohn, S. I., Baek, S. R. e Lee, M. G. Pharmacokinetics of liquiritigenin in mice, rats, rabbits, and dogs, and animal scale-up. J Pharm Sci, v.98, n.11, Nov, p.4327-42. 2009.

Karlsson, P. C., Huss, U., Jenner, A., Halliwell, B., Bohlin, L. e Rafter, J. J. Human fecal water inhibits COX-2 in colonic HT-29 cells: role of phenolic compounds. J Nutr, v.135, n.10, Oct, p.2343-9. 2005.

Kaser, A., Zeissig, S. e Blumberg, R. S. Inflammatory bowel disease. Annu Rev Immunol, v.28, Mar, p.573-621. 2010a.

_____. Genes and environment: how will our concepts on the pathophysiology of IBD develop in the future? Dig Dis, v.28, n.3, p.395-405. 2010b.

Katayama, K., Wada, K., Nakajima, A., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., Nakagawa, S., Kadowaki, T., Nagai, R., Kamisaki, Y., Blumberg, R. S. e Mayumi, T. A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. Gastroenterology, v.124, n.5, May, p.1315-24. 2003.

Keppler, K. e Humpf, H. U. Metabolism of anthocyanins and their phenolic degradation products by the intestinal microflora. Bioorg Med Chem, v.13, n.17, Sep 1, p.5195-205. 2005.

Kim, D. H., Jung, E. A., Sohng, I. S., Han, J. A., Kim, T. H. e Han, M. J. Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities. Arch Pharm Res, v.21, n.1, Feb, p.17-23. 1998.

Kim, H., Kong, H., Choi, B., Yang, Y., Kim, Y., Lim, M. J., Neckers, L. e Jung, Y. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. Pharm Res, v.22, n.9, Sep, p.1499-509. 2005.

_____. Metabolic and pharmacological properties of rutin, a dietary quercetin glycoside, for treatment of inflammatory bowel disease. Pharm Res, v.22, n.9, Sep, p.1499-509. 2005a.

Kim, H., Park, B. S., Lee, K. G., Choi, C. Y., Jang, S. S., Kim, Y. H. e Lee, S. E. Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid. J Agric Food Chem, v.53, n.22, Nov 2, p.8537-41. 2005d.

Kim, J. S. e Jobin, C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. Immunology, v.115, n.3, Jul, p.375-87. 2005c.

Kimball, E. S., Schneider, C. R., Wallace, N. H. e Hornby, P. J. Agonists of cannabinoid receptor 1 and 2 inhibit experimental colitis induced by oil of mustard and by dextran sulfate sodium. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.291, n.2, Aug, p.G364-71. 2006.

Kimball, E. S., Wallace, N. H., Schneider, C. R., D'andrea, M. R. e Hornby, P. J. Vanilloid receptor 1 antagonists attenuate disease severity in dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. Neurogastroenterol Motil, v.16, n.6, Dec, p.811-8. 2004.

Kimira, M., Arai, Y., Shimoi, K. e Watanabe, S. Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. J Epidemiol, v.8, n.3, Aug, p.168-75. 1998.

Kitajima, S., Takuma, S. e Morimoto, M. Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. Exp Anim, v.48, n.3, Jul, p.137-43. 1999.

Knowles, C. H. e Aziz, Q. Basic and clinical aspects of gastrointestinal pain. Pain, v.141, n.3, Feb, p.191-209. 2009.

Ko, C. H., Shen, S. C., Lee, T. J. e Chen, Y. C. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. Mol Cancer Ther, v.4, n.2, Feb, p.281-90. 2005.

Kolls, J. K. e Linden, A. Interleukin-17 family members and inflammation. Immunity, v.21, n.4, Oct, p.467-76. 2004.

Kostiainen, R. e Kauppila, T. J. Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A, v.1216, n.4, Jan 23, p.685-99. 2009.

Kostyuk, V. A., Kraemer, T., Sies, H. e Schewe, T. Myeloperoxidase/nitrite-mediated lipid peroxidation of low-density lipoprotein as modulated by flavonoids. FEBS Lett, v.537, n.1-3, Feb 27, p.146-50. 2003.

Krajka-Kuzniak, V., Kaczmarek, J. e Baer-Dubowska, W. Effect of naturally occurring phenolic acids on the expression of glutathione S-transferase isozymes in the rat. Food Chem Toxicol, v.46, n.3, Mar, p.1097-102. 2008.

Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J. D., Daly, M. J. e Xavier, R. J. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. PLoS One, v.3, n.10, p.e3391. 2008.

Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. e Muller, W. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell, v.75, n.2, Oct 22, p.263-74. 1993.

Kwon, K. H., Murakami, A., Tanaka, T. e Ohigashi, H. Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. Biochem Pharmacol, v.69, n.3, Feb 1, p.395-406. 2005.

Kyo, R., Nakahata, N., Sakakibara, I., Kubo, M. e Ohizumi, Y. Baicalin and baicalein, constituents of an important medicinal plant, inhibit intracellular Ca²⁺ elevation by reducing phospholipase C activity in C6 rat glioma cells. J Pharm Pharmacol, v.50, n.10, Oct, p.1179-82. 1998.

Kyriakis, J. M. e Avruch, J. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. Physiol Rev, v.92, n.2, Apr, p.689-737. 2012.

Labib, S., Erb, A., Kraus, M., Wickert, T. e Richling, E. The pig caecum model: a suitable tool to study the intestinal metabolism of flavonoids. Mol Nutr Food Res, v.48, n.4, Sep, p.326-32. 2004.

Lakatos, L. e Lakatos, P. L. Is the incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases increasing in Eastern Europe? Postgrad Med J, v.82, n.967, May, p.332-7. 2006.

Lakatos, P. L. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down? World J Gastroenterol, v.12, n.38, Oct 14, p.6102-8. 2006.

Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Paya, C. V. e Moscat, J. Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. Mol Cell Biol, v.19, n.3, Mar, p.2180-8. 1999.

Lambert, J. D., Lee, M. J., Lu, H., Meng, X., Hong, J. J., Seril, D. N., Sturgill, M. G. e Yang, C. S. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. J Nutr, v.133, n.12, Dec, p.4172-7. 2003.

Larrosa, M., Luceri, C., Vivoli, E., Pagliuca, C., Lodovici, M., Moneti, G. e Dolara, P. Polyphenol metabolites from colonic microbiota exert anti-inflammatory activity on different inflammation models. Mol Nutr Food Res, v.53, n.8, Aug, p.1044-54. 2009.

Lawrence, T., Willoughby, D. A. e Gilroy, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. Nat Rev Immunol, v.2, n.10, Oct, p.787-95. 2002.

Lee, J. C. e Lennard-Jones, J. E. Inflammatory bowel disease in 67 families each with three or more affected first-degree relatives. Gastroenterology, v.111, n.3, Sep, p.587-96. 1996.

Lee, M. J., Maliakal, P., Chen, L., Meng, X., Bondoc, F. Y., Prabhu, S., Lambert, G., Mohr, S. e Yang, C. S. Pharmacokinetics of tea catechins after ingestion of green tea and (-)-epigallocatechin-3-gallate by humans: formation of different metabolites and individual variability. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.11, n.10 Pt 1, Oct, p.1025-32. 2002.

Lewis, T. S., Shapiro, P. S. e Ahn, N. G. Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv Cancer Res, v.74, p.49-139. 1998.

Li, W., Zhang, J. e Tse, F. L. Strategies in quantitative LC-MS/MS analysis of unstable small molecules in biological matrices. Biomed Chromatogr, v.25, n.1-2, Jan, p.258-77. 2011.

Li, X. N., Parikh, S., Shu, Q., Jung, H. L., Chow, C. W., Perlaky, L., Leung, H. C., Su, J., Blaney, S. e Lau, C. C. Phenylbutyrate and phenylacetate induce differentiation and inhibit proliferation of human medulloblastoma cells. Clin Cancer Res, v.10, n.3, Feb 1, p.1150-9. 2004.

Liang, Y. C., Huang, Y. T., Tsai, S. H., Lin-Shiau, S. Y., Chen, C. F. e Lin, J. K. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. Carcinogenesis, v.20, n.10, Oct, p.1945-52. 1999.

Lin, J. H. e Lu, A. Y. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. Pharmacol Rev, v.49, n.4, Dec, p.403-49. 1997.

Lough, W. J., Wainer, I. W. High Performance Liquid Chromatography, Fundamental Principles and Practice Glasgow. 1995. 276 p.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. e Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, v.193, n.1, Nov, p.265-75. 1951.

Ma, J., Luo, X. D., Protiva, P., Yang, H., Ma, C., Basile, M. J., Weinstein, I. B. e Kennelly, E. J. Bioactive novel polyphenols from the fruit of Manilkara zapota (Sapodilla). J Nat Prod, v.66, n.7, Jul, p.983-6. 2003.

Macdonald, T. T., Monteleone, I., Fantini, M. C. e Monteleone, G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. Gastroenterology, v.140, n.6, May, p.1768-75. 2011.

Mach, J., Hshieh, T., Hsieh, D., Grubbs, N. e Chervonsky, A. Development of intestinal M cells. Immunol Rev, v.206, Aug, p.177-89. 2005.

Madretsma, S., Wolters, L. M., Van Dijk, J. P., Tak, C. J., Feyerabend, C., Wilson, J. H. e Zijlstra, F. J. In-vivo effect of nicotine on cytokine production by human non-adherent mononuclear cells. Eur J Gastroenterol Hepatol, v.8, n.10, Oct, p.1017-20. 1996.

Maeda, M., Watanabe, N., Neda, H., Yamauchi, N., Okamoto, T., Sasaki, H., Tsuji, Y., Akiyama, S., Tsuji, N. e Niitsu, Y. Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. Immunopharmacol Immunotoxicol, v.14, n.3, p.451-61. 1992.

Magalhaes, J. G., Tattoli, I. e Girardin, S. E. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. Semin Immunol, v.19, n.2, Apr, p.106-15. 2007.

Maloy, K. J. e Powrie, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. Nature, v.474, n.7351, Jun 16, p.298-306. 2011.

Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M. L., Agullo, G., Demigne, C., Regeat, F. e Remesy, C. Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. J Nutr, v.125, n.7, Jul, p.1911-22. 1995.

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C. e Jimenez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr, v.79, n.5, May, p.727-47. 2004.

Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A. e Remesy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. Am J Clin Nutr, v.81, n.1 Suppl, Jan, p.230S-242S. 2005.

Mantle, D., Falkous, G. e Perry, E. K. Effect of flavonoids on protease activities in human skeletal muscle tissue in vitro. Clin Chim Acta, v.285, n.1-2, Jul, p.13-20. 1999.

Marshall, C. J. Cell signalling. Raf gets it together. Nature, v.383, n.6596, Sep 12, p.127-8. 1996.

Mayer, E. A., Berman, S., Suyenobu, B., Labus, J., Mandelkern, M. A., Naliboff, B. D. e Chang, L. Differences in brain responses to visceral pain between patients with irritable bowel syndrome and ulcerative colitis. Pain, v.115, n.3, Jun, p.398-409. 2005.

Mazzucchelli, L., Hauser, C., Zraggen, K., Wagner, H., Hess, M., Laissue, J. A. e Mueller, C. Expression of interleukin-8 gene in inflammatory bowel disease is related to the histological grade of active inflammation. Am J Pathol, v.144, n.5, May, p.997-1007. 1994.

Mccafferty, D. M., Miampamba, M., Sihota, E., Sharkey, K. A. e Kubes, P. Role of inducible nitric oxide synthase in trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in mice. Gut, v.45, n.6, Dec, p.864-73. 1999.

McMahon, S. B., Cafferty, W. B. e Marchand, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. Exp Neurol, v.192, n.2, Apr, p.444-62. 2005.

Medina, J. H., Viola, H., Wolfman, C., Marder, M., Wasowski, C., Calvo, D. e Paladini, A. C. Overview--flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. Neurochem Res, v.22, n.4, Apr, p.419-25. 1997.

Meibohm, B. e Derendorf, H. Basic concepts of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) modelling. Int J Clin Pharmacol Ther, v.35, n.10, Oct, p.401-13. 1997.

Melmed, G. Y. e Targan, S. R. Future biologic targets for IBD: potentials and pitfalls. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, v.7, n.2, Feb, p.110-7. 2010.

Mendell, J. R. e Sahenk, Z. Clinical practice. Painful sensory neuropathy. N Engl J Med, v.348, n.13, Mar 27, p.1243-55. 2003.

Meotti, F. C., Luiz, A. P., Pizzolatti, M. G., Kassuya, C. A., Calixto, J. B. e Santos, A. R. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. J Pharmacol Exp Ther, v.316, n.2, Feb, p.789-96. 2006b.

Meotti, F. C., Missau, F. C., Ferreira, J., Pizzolatti, M. G., Mizuzaki, C., Nogueira, C. W. e Santos, A. R. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. Biochem Pharmacol, v.72, n.12, Dec 15, p.1707-13. 2006a.

Meotti, F. C., Posser, T., Missau, F. C., Pizzolatti, M. G., Leal, R. B. e Santos, A. R. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. Biochem Pharmacol, v.74, n.6, Sep 15, p.924-31. 2007b.

Middleton, E., Jr., Kandaswami, C. e Theoharides, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. Pharmacol Rev, v.52, n.4, Dec, p.673-751. 2000.

Mitsuyama, K., Sata, M. e Rose-John, S. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. Cytokine Growth Factor Rev, v.17, n.6, Dec, p.451-61. 2006.

Moncada, S., Palmer, R. M. e Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, v.43, n.2, Jun, p.109-42. 1991.

Morris, G. P., Beck, P. L., Herridge, M. S., Depew, W. T., Szewczuk, M. R. e Wallace, J. L. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. Gastroenterology, v.96, n.3, Mar, p.795-803. 1989.

Mullen, W., Rouanet, J. M., Auger, C., Teissedre, P. L., Caldwell, S. T., Hartley, R. C., Lean, M. E., Edwards, C. A. e Crozier, A. Bioavailability of [2-(14)C]quercetin-4'-glucoside in rats. J Agric Food Chem, v.56, n.24, Dec 24, p.12127-37. 2008.

Nathan, C. e Xie, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell, v.78, n.6, Sep 23, p.915-8. 1994.

Natsui, M., Kawasaki, K., Takizawa, H., Hayashi, S. I., Matsuda, Y., Sugimura, K., Seki, K., Narisawa, R., Sendo, F. e Asakura, H. Selective depletion of neutrophils by a monoclonal antibody, RP-3, suppresses dextran sulphate sodium-induced colitis in rats. J Gastroenterol Hepatol, v.12, n.12, Dec, p.801-8. 1997.

Natsume, M., Osakabe, N., Oyama, M., Sasaki, M., Baba, S., Nakamura, Y., Osawa, T. e Terao, J. Structures of (-)-epicatechin glucuronide identified from plasma and urine after oral ingestion of (-)-epicatechin: differences between human and rat. Free Radic Biol Med, v.34, n.7, Apr 1, p.840-9. 2003.

Needham, S. R., Brown, P. R., Duff, K. e Bell, D. Optimized stationary phases for the high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric analysis of basic pharmaceuticals. J Chromatogr A, v.869, n.1-2, Feb 11, p.159-70. 2000.

Nemeth, T. e Mocsai, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. Immunol Lett, v.143, n.1, Mar 30, p.9-19. 2012.

Neurath, M. F., Pettersson, S., Meyer Zum Buschenfelde, K. H. e Strober, W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. Nat Med, v.2, n.9, Sep, p.998-1004. 1996.

Newton, A. C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. Biochem J, v.370, n.Pt 2, Mar 1, p.361-71. 2003.

Nora, F. S. Total intravenous anesthesia as a target-controlled infusion. An evolutive analysis. Rev Bras Anesthesiol, v.58, n.2, Mar-Apr, p.179-92. 2008.

O'leary, K. A., De Pascual-Tereasa, S., Needs, P. W., Bao, Y. P., O'brien, N. M. e Williamson, G. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. Mutat Res, v.551, n.1-2, Jul 13, p.245-54. 2004.

Ogura, Y., Bonen, D. K., Inohara, N., Nicolae, D. L., Chen, F. F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R. H., Achkar, J. P., Brant, S. R., Bayless, T. M., Kirschner, B. S., Hanauer, S. B., Nunez, G. e Cho, J. H. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. Nature, v.411, n.6837, May 31, p.603-6. 2001.

Oh, P. S., Lee, S. J. e Lim, K. T. Glycoprotein isolated from *Rhus verniciflua* Stokes inhibits inflammation-related protein and nitric oxide production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Biol Pharm Bull, v.30, n.1, Jan, p.111-6. 2007.

Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y. e Nakaya, R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. Gastroenterology, v.98, n.3, Mar, p.694-702. 1990.

Ouyang, Q., Tandon, R., Goh, K. L., Ooi, C. J., Ogata, H. e Fiocchi, C. The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region. Curr Opin Gastroenterol, v.21, n.4, Jul, p.408-13. 2005.

Owczarek, D., Cibor, D., Szczepanek, M. e Mach, T. Biological therapy of inflammatory bowel disease. Pol Arch Med Wewn, v.119, n.1-2, Jan-Feb, p.84-8. 2009.

Paladini, A. C., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C. e Medina, J. H. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. J Pharm Pharmacol, v.51, n.5, May, p.519-26. 1999.

Palmen, M. J., Dijkstra, C. D., Van Der Ende, M. B., Pena, A. S. e Van Rees, E. P. Anti-CD11b/CD18 antibodies reduce inflammation in acute colitis in rats. Clin Exp Immunol, v.101, n.2, Aug, p.351-6. 1995.

Pereira, A. S., B. Bicalho, S. Lilla, G. De Nucci. DESAFIOS DA QUÍMICA ANALÍTICA FRENTE ÀS NECESSIDADES DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA. Quimica Nova, v.Vol. 28, n.Suplemento, S107-S111., 2005.

Pereira, M., Siba, I. P., Chioca, L. R., Correia, D., Vital, M. A., Pizzolatti, M. G., Santos, A. R. e Andreatini, R. Myricitrin, a nitric oxide and protein kinase C inhibitor, exerts antipsychotic-like effects in animal models. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, v.35, n.7, Aug 15, p.1636-44. 2011.

Pietta, P. G. Flavonoids as antioxidants. J Nat Prod, v.63, n.7, Jul, p.1035-42. 2000.

Pinho, G. P., Queiroz, M. E. L. R., Neves, A. A., Silverio, F. O. . Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. Quim. Nova, v.32, n.4, p.987-995. 2009.

Piskula, M. K. e Terao, J. Accumulation of (-)-epicatechin metabolites in rat plasma after oral administration and distribution of conjugation enzymes in rat tissues. J Nutr, v.128, n.7, Jul, p.1172-8. 1998.

Piskula, M. K., Yamakoshi, J. e Iwai, Y. Daidzein and genistein but not their glucosides are absorbed from the rat stomach. FEBS Lett, v.447, n.2-3, Mar 26, p.287-91. 1999.

Podolsky, D. K. The current future understanding of inflammatory bowel disease. Best Pract Res Clin Gastroenterol, v.16, n.6, Dec, p.933-43. 2002.

Pohl, C., Hombach, A. e Kruis, W. Chronic inflammatory bowel disease and cancer. Hepatogastroenterology, v.47, n.31, Jan-Feb, p.57-70. 2000.

Popivanova, B. K., Kitamura, K., Wu, Y., Kondo, T., Kagaya, T., Kaneko, S., Oshima, M., Fujii, C. e Mukaida, N. Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. J Clin Invest, v.118, n.2, Feb, p.560-70. 2008.

Prentis, R. A., Lis, Y. e Walker, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). Br J Clin Pharmacol, v.25, n.3, Mar, p.387-96. 1988.

Pullan, R. D., Rhodes, J., Ganesh, S., Mani, V., Morris, J. S., Williams, G. T., Newcombe, R. G., Russell, M. A., Feyerabend, C., Thomas, G. A. e Et Al. Transdermal nicotine for active ulcerative colitis. N Engl J Med, v.330, n.12, Mar 24, p.811-5. 1994.

Rachmilewitz, D., Karmeli, F., Okon, E. e Bursztyn, M. Experimental colitis is ameliorated by inhibition of nitric oxide synthase activity. Gut, v.37, n.2, Aug, p.247-55. 1995.

Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M. e Di Carlo, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. Life Sci, v.68, n.8, Jan 12, p.921-31. 2001.

Reimund, J. M., Wittersheim, C., Dumont, S., Muller, C. D., Baumann, R., Poindron, P. e Duclos, B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. J Clin Immunol, v.16, n.3, May, p.144-50. 1996.

Reinecker, H. C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., Macdermott, R. P. e Raedler, A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Clin Exp Immunol, v.94, n.1, Oct, p.174-81. 1993.

Ribani, M., C. B. G. Bottoli, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, L. F. C. Melo. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. Quim. Nova, v.27, No. 5, 771-780., 2004.

Richards, M. E., Rickert, R. R. e Nance, F. C. Crohn's disease-associated carcinoma. A poorly recognized complication of inflammatory bowel disease. Ann Surg, v.209, n.6, Jun, p.764-73. 1989.

Roediger, W. E., Lawson, M. J., Nance, S. H. e Radcliffe, B. C. Detectable colonic nitrite levels in inflammatory bowel disease--mucosal or bacterial malfunction? Digestion, v.35, n.4, p.199-204. 1986.

Rogler, G. e Andus, T. Cytokines in inflammatory bowel disease. World J Surg, v.22, n.4, Apr, p.382-9. 1998a.

Rogler, G., Brand, K., Vogl, D., Page, S., Hofmeister, R., Andus, T., Knuechel, R., Baeuerle, P. A., Scholmerich, J. e Gross, V. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. Gastroenterology, v.115, n.2, Aug, p.357-69. 1998b.

Rohatagi, S., Kan, S. e Derendorf, H. Non-compartmental analysis of pharmacokinetic data after multiple intravenous and oral administration. Pharmazie, v.52, n.7, Jul, p.529-32. 1997.

Romier, B., Schneider, Y. J., Larondelle, Y. e During, A. Dietary polyphenols can modulate the intestinal inflammatory response. Nutr Rev, v.67, n.7, Jul, p.363-78. 2009.

Romier, B., Van De Walle, J., During, A., Larondelle, Y. e Schneider, Y. J. Modulation of signalling nuclear factor-kappaB activation pathway by polyphenols in human intestinal Caco-2 cells. Br J Nutr, v.100, n.3, Sep, p.542-51. 2008.

Rose-John, S., Mitsuyama, K., Matsumoto, S., Thaiss, W. M. e Scheller, J. Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. Curr Pharm Des, v.15, n.18, p.2095-103. 2009.

Roy, P. K., Rashid, F., Bragg, J. e Ibdah, J. A. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol, v.14, n.2, Jan 14, p.200-2. 2008.

Ruiz, P. A., Braune, A., Holzwimmer, G., Quintanilla-Fend, L. e Haller, D. Quercetin inhibits TNF-induced NF-kappaB transcription factor recruitment to proinflammatory gene promoters in murine intestinal epithelial cells. J Nutr, v.137, n.5, May, p.1208-15. 2007.

Ruiz, P. A. e Haller, D. Functional diversity of flavonoids in the inhibition of the proinflammatory NF-kappaB, IRF, and Akt signaling pathways in murine intestinal epithelial cells. J Nutr, v.136, n.3, Mar, p.664-71. 2006.

Sadlack, B., Merz, H., Schorle, H., Schimpl, A., Feller, A. C. e Horak, I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. Cell, v.75, n.2, Oct 22, p.253-61. 1993.

Santangelo, C., Vari, R., Scazzocchio, B., Di Benedetto, R., Filesi, C. e Masella, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. Ann Ist Super Sanita, v.43, n.4, p.394-405. 2007.

Sartor, L., Pezzato, E., Dell'aica, I., Caniato, R., Biggin, S. e Garbisa, S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. Biochem Pharmacol, v.64, n.2, Jul 15, p.229-37. 2002.

Sartor, R. B. Cytokines in intestinal inflammation: pathophysiological and clinical considerations. Gastroenterology, v.106, n.2, Feb, p.533-9. 1994.

_____. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, v.3, n.7, Jul, p.390-407. 2006.

_____. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. Gastroenterology, v.134, n.2, Feb, p.577-94. 2008.

Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Remesy, C. e Jimenez, L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. Crit Rev Food Sci Nutr, v.45, n.4, p.287-306. 2005.

Scalbert, A., Morand, C., Manach, C. e Remesy, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. Biomed Pharmacother, v.56, n.6, Aug, p.276-82. 2002.

Scalbert, A. e Williamson, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr, v.130, n.8S Suppl, Aug, p.2073S-85S. 2000.

Scheller, J., Ohnesorge, N. e Rose-John, S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. Scand J Immunol, v.63, n.5, May, p.321-9. 2006.

Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., Franco, L., Ferro, E. e De Arias, A. R. Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxidase inhibitory activity. J Ethnopharmacol, v.21, n.2, Nov, p.183-6. 1987.

Schoefer, L., Mohan, R., Braune, A., Birringer, M. e Blaut, M. Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by *Eubacterium ramulus*. FEMS Microbiol Lett, v.208, n.2, Mar 5, p.197-202. 2002.

Schoefer, L., Mohan, R., Schwiertz, A., Braune, A. e Blaut, M. Anaerobic degradation of flavonoids by *Clostridium orbiscindens*. Appl Environ Microbiol, v.69, n.10, Oct, p.5849-54. 2003.

Schreiber, S., Nikolaus, S. e Hampe, J. Activation of nuclear factor kappa B in inflammatory bowel disease. Gut, v.42, n.4, Apr, p.477-84. 1998.

Schwab, J. M. e Serhan, C. N. Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of inflammation. Curr Opin Pharmacol, v.6, n.4, Aug, p.414-20. 2006.

Sesink, A. L., O'leary, K. A. e Hollman, P. C. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. J Nutr, v.131, n.7, Jul, p.1938-41. 2001.

Shah, V. P., Midha, K. K., Findlay, J. W., Hill, H. M., Hulse, J. D., Mcgilveray, I. J., McKay, G., Miller, K. J., Patnaik, R. N., Powell, M. L., Tonelli, A., Viswanathan, C. T. e Yacobi, A. Bioanalytical method validation--a revisit with a decade of progress. Pharm Res, v.17, n.12, Dec, p.1551-7. 2000.

Sharma, V. e McNeill, J. H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. Br J Pharmacol, v.157, n.6, Jul, p.907-21. 2009.

Shih, D. Q. e Targan, S. R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol, v.14, n.3, Jan 21, p.390-400. 2008.

Singer, Ii, Kawka, D. W., Scott, S., Weidner, J. R., Mumford, R. A., Riehl, T. E. e Stenson, W. F. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. Gastroenterology, v.111, n.4, Oct, p.871-85. 1996.

Singh, S. P., Ali, M. M. e Jain, G. K. High-throughput quantification of isoflavones, biochanin A and genistein, and their conjugates in female rat plasma using LC-ESI-MS/MS: Application in pharmacokinetic study. J Sep Sci, v.33, n.21, Nov, p.3326-34. 2010.

Smith, J. A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. J Leukoc Biol, v.56, n.6, Dec, p.672-86. 1994.

Soehnlein, O., Weber, C. e Lindbom, L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. Trends Immunol, v.30, n.11, Nov, p.538-46. 2009.

Souza, A. L., Moreira, F. A., Almeida, K. R., Bertollo, C. M., Costa, K. A. e Coelho, M. M. In vivo evidence for a role of protein kinase C in

peripheral nociceptive processing. Br J Pharmacol, v.135, n.1, Jan, p.239-47. 2002.

Spehlmann, M. E. e Eckmann, L. Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. Curr Opin Gastroenterol, v.25, n.2, Mar, p.92-9. 2009.

Steinhoff, U., Brinkmann, V., Klemm, U., Aichele, P., Seiler, P., Brandt, U., Bland, P. W., Prinz, I., Zugel, U. e Kaufmann, S. H. Autoimmune intestinal pathology induced by hsp60-specific CD8 T cells. Immunity, v.11, n.3, Sep, p.349-58. 1999.

Strober, W., Fuss, I. e Mannon, P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease. J Clin Invest, v.117, n.3, Mar, p.514-21. 2007.

Strober, W., Fuss, I. J. e Blumberg, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. Annu Rev Immunol, v.20, p.495-549. 2002.

Suenaert, P., Bulteel, V., Lemmens, L., Noman, M., Geypens, B., Van Assche, G., Geboes, K., Ceuppens, J. L. e Rutgeerts, P. Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease. Am J Gastroenterol, v.97, n.8, Aug, p.2000-4. 2002.

Tak, P. P. e Firestein, G. S. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest, v.107, n.1, Jan, p.7-11. 2001.

Takeda, K., Clausen, B. E., Kaisho, T., Tsujimura, T., Terada, N., Forster, I. e Akira, S. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. Immunity, v.10, n.1, Jan, p.39-49. 1999.

Tamboli, C. P., Neut, C., Desreumaux, P. e Colombel, J. F. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. Gut, v.53, n.1, Jan, p.1-4. 2004.

Thompson, M., Ellison, S. L. R. And Wood, R. . HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLELABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS. Pure Appl. Chem., v.74, No. 5, pp. 835–855,. 2002.

Toton, E., Ignatowicz, E., Skrzeczkowska, K. e Rybczynska, M. Protein kinase Cepsilon as a cancer marker and target for anticancer therapy. Pharmacol Rep, v.63, n.1, p.19-29. 2011.

Toutain, P. L., Ferran, A. e Bousquet-Melou, A. Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. Handb Exp Pharmacol, n.199, p.19-48. 2010.

Tsacheva, I., Rostan, J., Iossifova, T., Vogler, B., Odjakova, M., Navas, H., Kostova, I., Kojouharova, M. e Kraus, W. Complement inhibiting properties of dragon's blood from *Croton draco*. Z Naturforsch C, v.59, n.7-8, Jul-Aug, p.528-32. 2004.

Vainchtein, L. D., Rosing, H., Mirejovsky, D., Lenaz, L., Schellens, J. H. e Beijnen, J. H. Stability experiments in human urine with EO9 (apaziquone): a novel anticancer agent for the intravesical treatment of bladder cancer. J Pharm Biomed Anal, v.43, n.1, Jan 4, p.285-92. 2007.

Van Der Sluis, M., De Koning, B. A., De Bruijn, A. C., Velcich, A., Meijerink, J. P., Van Goudoever, J. B., Buller, H. A., Dekker, J., Van Seuning, I., Renes, I. B. e Einerhand, A. W. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. Gastroenterology, v.131, n.1, Jul, p.117-29. 2006.

Van Deventer, S. J. Immunotherapy of Crohn's disease. Scand J Immunol, v.51, n.1, Jan, p.18-22. 2000.

Vaughan, D. P. e Hope, I. Applications of a recirculatory stochastic pharmacokinetic model: limitations of compartmental models. J Pharmacokinet Biopharm, v.7, n.2, Apr, p.207-25. 1979.

Vekey, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. J Chromatogr A, v.921, n.2, Jul 6, p.227-36. 2001.

Verma-Gandhu, M., Bercik, P., Motomura, Y., Verdu, E. F., Khan, W. I., Blennerhassett, P. A., Wang, L., El-Sharkawy, R. T. e Collins, S. M. CD4+ T-cell modulation of visceral nociception in mice. Gastroenterology, v.130, n.6, May, p.1721-8. 2006.

Verma-Gandhu, M., Verdu, E. F., Bercik, P., Blennerhassett, P. A., Al-Mutawaly, N., Ghia, J. E. e Collins, S. M. Visceral pain perception is

determined by the duration of colitis and associated neuropeptide expression in the mouse. Gut, v.56, n.3, Mar, p.358-64. 2007.

Vissiennon, C., Nieber, K., Kelber, O. e Butterweck, V. Route of administration determines the anxiolytic activity of the flavonols kaempferol, quercetin and myricetin - are they prodrugs? J Nutr Biochem, Aug 11. 2011.

Vugmeyster, Y., Xu, X., Theil, F. P., Khawli, L. A. e Leach, M. W. Pharmacokinetics and toxicology of therapeutic proteins: Advances and challenges. World J Biol Chem, v.3, n.4, Apr 26, p.73-92. 2012.

Wadsworth, T. L., Mcdonald, T. L. e Koop, D. R. Effects of Ginkgo biloba extract (EGb 761) and quercetin on lipopolysaccharide-induced signaling pathways involved in the release of tumor necrosis factor-alpha. Biochem Pharmacol, v.62, n.7, Oct 1, p.963-74. 2001.

Waetzig, G. H. e Schreiber, S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. Aliment Pharmacol Ther, v.18, n.1, Jul 1, p.17-32. 2003.

Waetzig, G. H., Seegert, D., Rosenstiel, P., Nikolaus, S. e Schreiber, S. p38 mitogen-activated protein kinase is activated and linked to TNF-alpha signaling in inflammatory bowel disease. J Immunol, v.168, n.10, May 15, p.5342-51. 2002.

Wallace, J. L. COX-2: a pivotal enzyme in mucosal protection and resolution of inflammation. ScientificWorldJournal, v.6, p.577-88. 2006.

Weiss, S. J. Tissue destruction by neutrophils. N Engl J Med, v.320, n.6, Feb 9, p.365-76. 1989.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. e Johnson, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev, v.79, n.1, Jan, p.143-80. 1999.

Willing, B. P., Dicksved, J., Halfvarson, J., Andersson, A. F., Lucio, M., Zheng, Z., Järnerot, G., Tysk, C., Jansson, J. K. e Engstrand, L. A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial

profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes. Gastroenterology, v.139, n.6, Dec, p.1844-1854 e1. 2010.

Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Roth, J. R. e Baumler, A. J. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. Nature, v.467, n.7314, Sep 23, p.426-9. 2010.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. e Neurath, M. F. Chemically induced mouse models of intestinal inflammation. Nat Protoc, v.2, n.3, p.541-6. 2007.

Wirtz, S. e Neurath, M. F. Animal models of intestinal inflammation: new insights into the molecular pathogenesis and immunotherapy of inflammatory bowel disease. Int J Colorectal Dis, v.15, n.3, Jun, p.144-60. 2000.

Wolfsegger, M. J. e Jaki, T. Non-compartmental estimation of pharmacokinetic parameters in serial sampling designs. J Pharmacokinet Pharmacodyn, v.36, n.5, Oct, p.479-94. 2009.

Wu, Z., Gao, W., Phelps, M. A., Wu, D., Miller, D. D. e Dalton, J. T. Favorable effects of weak acids on negative-ion electrospray ionization mass spectrometry. Anal Chem, v.76, n.3, Feb 1, p.839-47. 2004.

Wullaert, A. Role of NF-kappaB activation in intestinal immune homeostasis. Int J Med Microbiol, v.300, n.1, Jan, p.49-56. 2010.

Xagorari, A., Papapetropoulos, A., Mauromatis, A., Economou, M., Fotsis, T. e Roussos, C. Luteolin inhibits an endotoxin-stimulated phosphorylation cascade and proinflammatory cytokine production in macrophages. J Pharmacol Exp Ther, v.296, n.1, Jan, p.181-7. 2001.

Xavier, C. R. Associação da isoflavona genisteína com beta-ciclodextrina: avaliação da penetração cutânea. (Dissertação). Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006. 149 p.

Xavier, R. J. e Podolsky, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. Nature, v.448, n.7152, Jul 26, p.427-34. 2007.

Xiao, H., Heeringa, P., Liu, Z., Huugen, D., Hu, P., Maeda, N., Falk, R. J. e Jennette, J. C. The role of neutrophils in the induction of glomerulonephritis by anti-myeloperoxidase antibodies. Am J Pathol, v.167, n.1, Jul, p.39-45. 2005.

Xiao, J. e Kai, G. A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. Crit Rev Food Sci Nutr, v.52, n.1, p.85-101. 2012.

Yiangou, Y., Facer, P., Dyer, N. H., Chan, C. L., Knowles, C., Williams, N. S. e Anand, P. Vanilloid receptor 1 immunoreactivity in inflamed human bowel. Lancet, v.357, n.9265, Apr 28, p.1338-9. 2001.

Yokomizo, A. e Moriwaki, M. Transepithelial permeability of myricitrin and its degradation by simulated digestion in human intestinal Caco-2 cell monolayer. Biosci Biotechnol Biochem, v.69, n.9, Sep, p.1774-6. 2005a.

_____. Myricitrin degraded by simulated digestion inhibits oxidation of human low-density lipoprotein. Biosci Biotechnol Biochem, v.69, n.4, Apr, p.693-9. 2005b.

Zeissig, S., Burgel, N., Gunzel, D., Richter, J., Mankertz, J., Wahnschaffe, U., Kroesen, A. J., Zeitz, M., Fromm, M. e Schulzke, J. D. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. Gut, v.56, n.1, Jan, p.61-72. 2007.

Zhao, D., Zhan, Y., Zeng, H., Koon, H. W., Moyer, M. P. e Pothoulakis, C. Neurotensin stimulates interleukin-8 expression through modulation of I kappa B alpha phosphorylation and p65 transcriptional activity: involvement of protein kinase C alpha. Mol Pharmacol, v.67, n.6, Jun, p.2025-31. 2005.

Zhao, X., Zhao, Y. L., Liu, X. M., Han, W. e Yu, Z. G. Simultaneous determination of six isoflavonoids in rat plasma after administration of

total flavonoid from Gegen by ultra-HPLC-MS/MS. J Sep Sci, v.35, n.8, Apr, p.984-93. 2012.

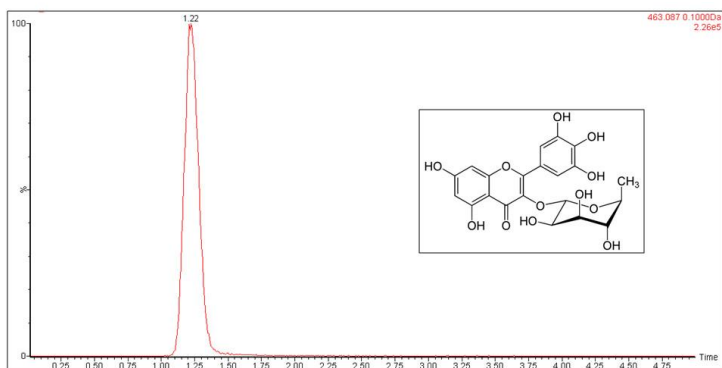
Zheng, J. J., Zhu, X. S., Huangfu, Z., Gao, Z. X., Guo, Z. R. e Wang, Z. Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. Chin J Dig Dis, v.6, n.4, p.175-81. 2005.

Zhou, Q., Price, D. D., Caudle, R. M. e Verne, G. N. Visceral and somatic hypersensitivity in a subset of rats following TNBS-induced colitis. Pain, v.134, n.1-2, Jan, p.9-15. 2008.

Zingarelli, B., Szabo, C. e Salzman, A. L. Reduced oxidative and nitrosative damage in murine experimental colitis in the absence of inducible nitric oxide synthase. Gut, v.45, n.2, Aug, p.199-209. 1999.

Zloch, Z. e Ginter, E. Effect of flavonoids on vitamin C activity of D-isoascorbic acid. Physiol Bohemoslov, v.28, n.6, p.519-24. 1979.

ANEXO 1

Perfil cromatográfico do padrão de miricitrina analisada pelo sistema LC-MS/MS (QTof)

ANEXO 2

Representação do espectro de íons (com fragmentação) do padrão de miricitrina analisada pelo sistema LC-MS/MS (QTof)