

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Investigação dos efeitos do floroglucinol e derivados sintéticos em  
*zebrafish* visando à atividade anticonvulsivante**

**SORAIA LUNARDELLI**

Porto Alegre, 2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Investigação dos efeitos do floroglucinol e derivados sintéticos em  
*zebrafish* visando à atividade anticonvulsivante**

Dissertação apresentada por

**Soraia Lunardelli**

para obtenção do GRAU DE MESTRE

em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Grace Gosmann  
Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Porto Alegre, 2015



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.03.2015, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Simone Cristina Baggio Gnoatto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Ângelo Piato

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Denis Rosemberg

Universidade Federal de Santa Maria

#### CIP - Catalogação na Publicação

Lunardelli, Soraia

Investigação dos efeitos do floroglucinol e derivados sintéticos em zebrafish visando à atividade anticonvulsivante / Soraia Lunardelli. -- 2015.  
89 f.

Orientador: Grace Gosmann.

Coorientador: Diogo Lösch de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Floroglucinol. 2. Zebrafish. 3. Convulsão. 4. Antidepressivo. I. Gosmann, Grace, orient. II. Lösch de Oliveira, Diogo, coorient. III. Título.



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia e no Laboratório Neurociência Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre, com financiamento do CNPq, CAPES e FAPERGS. O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq.





*“Nada disso é tudo e tudo isso é fundamental”.*

(Humberto Gessinger)



*Dedico este trabalho  
aos que fazem parte da minha família,  
por genética ou afeição.*



## AGRADECIMENTOS

*Agradeço ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho, à CAPES e FAPERGS, ao Laboratório 24- Bioquímica/UFRGS, à Central de RMN/UFRGS e à Central de Espectrometria de Massas/UFRGS, os quais disponibilizaram equipamento e material necessários para a realização dos experimentos práticos na elaboração da presente dissertação.*

Muito obrigada.



## RESUMO

O floroglucinol é um composto fenólico precursor de diversas moléculas com atividades biológicas já descritas na literatura, com destaque para a antidepressiva. O modelo experimental com *zebrafish* tem sido bastante utilizado em várias linhas de pesquisa biológica, como, por exemplo, para avaliação da atividade anticonvulsivante. A partir de estudos que mostram uma correlação entre compostos antidepressivos e anticonvulsivantes, nosso grupo administrou floroglucinol e dois derivados sintéticos (composto **7** e composto **8**) em *zebrafish* para observação da atividade locomotora e exploratória no *open tank* e, posteriormente, à avaliação através do modelo convulsivo induzido por pentilenotetrazol (PTZ). Além disso, os níveis de captação de glutamato e a toxicidade dos compostos foram avaliados em cérebro total de *zebrafish*. O comportamento dos animais não sofreu alteração em relação ao controle para nenhum dos compostos testados. O composto **7** aumentou significativamente o tempo para os animais atingirem a primeira convulsão além de reduzir a intensidade da crise convulsiva. Também se observou aumento na captação de glutamato para esse composto, sem sinais de toxicidade envolvidos. Desta forma, nossos resultados contribuem para a busca de compostos potencialmente ativos frente a crises convulsivas induzidas por PTZ.

**Palavras-chave:** floroglucinol, *zebrafish*, PTZ, glutamato, convulsão.





## ABSTRACT

Phloroglucinol, a phenolic compound, which is precursor of several molecules with biological activities are described in the literature, mainly for antidepressant activity. The zebrafish experimental model has been widely used in many kinds of biological research, for example, to evaluate the anticonvulsant activity. From studies that shows correlation between antidepressants and anticonvulsant compounds, our group managed phloroglucinol and two synthetic derivatives (compound **7** and compound **8**) in zebrafish in order to observe the locomotor and exploratory activity on open tank and subsequently, conduct the evaluation through the seizure model induced by pentylenetetrazol (PTZ). Furthermore, glutamate uptake and toxicity levels of the compounds were evaluated in zebrafish's whole brain. The animals' behavior did not change compared to control for any of the tested compounds. The compound **7** increased significantly the time for the animals reach the first seizure and reduce the seizure intensity. It was also observed an increase in glutamate uptake for this compound without signs of toxicity involved. Thus, our results contribute to the search for potentially active compounds against seizures induced by PTZ.

**Keywords:** phloroglucinol, zebrafish, PTZ, glutamate, seizure.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do floroglucinol 1. ....	23
Figura 2: Derivados do floroglucinol.....	26
Figura 3: <i>Zebrafish</i> adulto.....	32
Figura 4: (A) Ilustração do tanque de vidro trapezoidal (open tank) e suas dimensões específicas. (B) Divisão virtual do tanque em três áreas (fundo centro e topo). Adaptado de Rosemberg et al., 2011.....	47
Figura 5: Representação esquemática do delineamento experimental em <i>zebrafish</i> (comportamento seguido de teste convulsivo).....	48
Figura 6: Placa de 96 poços no ensaio de dosagem da LDH.....	50
Figura 7: Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação dos efeitos promovida pela exposição in vitro de floroglucinol e derivados em cérebro de <i>zebrafish</i> . ....	51
Figura 8: Resentação do mecanismo reação de Friedel Crafts. Fonte: Google imagens. Adaptado de Kurti, I., & Czakó, b. (2005). Strategic applications of named reactions in organic synthesis.....	53
Figura 9: Efeito do floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p., sobre a atividade locomotora e exploratória de <i>zebrafish</i> no aparato open tank. (A) Distância percorrida pelo animal (metros), (B) tempo no topo (s) e (C) tempo imóvel (s). Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de Tukey. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. ....	58
Figura 10: Efeito do floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p., sobre o tempo (s) necessário para o <i>zebrafish</i> atingir a primeira crise convulsiva induzida por ptz (10mM). Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. ***p<0,001. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de Tukey. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão.....	60
Figura 11: Perfil comportamental de convulsões induzidas por ptz 10 mm em <i>zebrafish</i> adultos tratados com floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p.. Escores da crise convulsiva (apenas a maior pontuação alcançada foi considerada em cada intervalo). Controle polissorbato 80 5% em água milliQ. Os dados estão representados como mediana ± intervalo interquartil.....	62
Figura 12: Perfil comportamental de convulsões induzidas por ptz 10 mm em <i>zebrafish</i> adulto tratados com floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p. Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. Os gráficos apresentam a freqüência cumulativa e os dados estão representados como o número de animais que atingiu o escore ao longo do tempo. ....	63
Figura 13: Intensidade da convulsão em <i>zebrafish</i> adultos tratados com floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p, durante os testes em períodos distintos (0-150, 150-300, e 300-1200 s) avaliados pela área sob a curva observada para cada tratamento. Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. Os resultados estão expressos em média ± erro padrão. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de Tukey.....	64
Figura 14: Latência (min) para o retorno ao nado normal após a indução convulsiva por ptz em <i>zebrafish</i> tratados com floroglucinol 1 (n=9), composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9) via i.p. *p<0,05, **p<0,01. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida	

de teste comparativo de Tukey. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. ....	65
Figura 15: Efeito do floroglucinol 1, composto 7 e composto 8 sobre a captação de glutamato Na <sup>+</sup> dependente. Os dados foram expressos como médias ± erro padrão da média (SEM) utilizando n = 6 por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, considerando as diferenças estatísticas de p ≤ 0,05. *Diferença significativa do grupo controle.....	65
Figura 16: Efeito do floroglucinol 1, composto 7 e composto 8 sobre a atividade da enzima Idh. Os dados foram expressos como médias ± erro padrão da média (sem) utilizando n = 6 por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, considerando as diferenças estatísticas de p ≤ 0,05. *Diferença significativa do grupo controle.....	69
Figura 17: Efeito do floroglucinol 1, composto 7 e composto 8 sobre a viabilidade celular mensurada pela redução do mtt. Os dados foram expressos como médias ± erro padrão da média (sem) utilizando n = 6 por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, considerando as diferenças estatísticas de p ≤ 0,05. *diferença significativa do grupo controle.....	71
Figura 18: Espectro de RMN de 1H do composto 7. ....	85
Figura 19: Espectro de RMN de 1H do composto 8. ....	86
Figura 20: Espectro de RMN de 1H do composto 9. ....	86
Figura 21: Espectro de RMN de 1H do composto 10. ....	87
Figura 22: Espectro de RMN de 13C do composto 7. ....	87
Figura 23: Espectro de RMN de 13C do composto 8. ....	88
Figura 24: Espectro de RMN de 13C do composto 9. ....	88
Figura 25: Espectro de RMN de 13C do composto 10.. ....	89
Figura 26: Parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais.....	89

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1. FLOROGLUCINOL E COMPOSTOS FENÓLICOS .....	23
1.2. EPILIPESIA E CONVULSÃO.....	26
1.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO .....	28
1.4. FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES .....	29
1.5. ZEBRAFISH .....	31
1.6. TESTES DE TOXICIDADE: MTT E LDH.....	32
1.7. ESTADO DA ARTE .....	33
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
3.1. PARTE QUÍMICA .....	39
3.1.1. GERAL .....	39
3.1.2. SÍNTESE DOS DERIVADOS DE FLOROGLUCINOL .....	40
3.1.2.1. SÍNTESE DE <b>2-METIL-1-(2,4,6-TRIIDROXIFENIL)PROPAN-1-ONA (7) E 2-METIL-1-[2,4,6-TRIIDROXI-3-(2 METILPROPANOIL)FENIL]PROPAN-1-ONA (8)</b> .....	41
3.1.2.2. SÍNTESE DE <b>2-METIL-1-(2,4,6-TRIMETOXIFENIL)PROPAN-1-ONA (9)</b> .....	42
3.1.2.2. SÍNTESE DE <b>1-(2,4,6-TRIIDROXIFENIL)ETAN-1-ONA (10)</b> .....	43
3.2. PARTE BIOLÓGICA.....	44
3.2.1. ENSAIOS BIOLÓGICOS .....	44
3.2.2. ZEBRAFISH .....	45
3.2.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	45
3.2.4. APARATOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	46
3.2.5. TESTE DE CONVULSÃO COM PENTILENOTETRAZOL .....	47
3.2.6. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA OS TESTES EM ESTRUTURA CEREBRAL DE <i>ZEBRAFISH</i> .....	48
3.2.7. CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO.....	48
3.2.8. TESTES DE TOXICIDADE: MTT E LDH.....	49

3.2.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	51
3.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
4.1. PARTE QUÍMICA .....	53
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO FLUROGLUCINOL E DERIVADOS SINTÉTICOS.....	56
4.2.1. EFEITO DO FLUROGLUCINOL E SEUS DERIVADOS SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA.....	57
4.2.2. EFEITOS DO FLUROGLUCINOL E SEUS DERIVADOS SOBRE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR PTZ EM <i>ZEBRAFISH</i> : TEMPO DE LATÊNCIA PARA CRISE CONVULSIVA; FREQUÊNCIA ACUMULADA DA CONVULSÃO; PERFIL CONVULSIVO E INTENSIDADE DA CONVULSÃO.	59
4.2.3. EFEITOS DO FLUROGLUCINOL E SEUS DERIVADOS SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ATRAVÉS DE MTT E LDH EM CÉREBRO DE <i>ZEBRAFISH</i> .....	65
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>73</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
<b>7. ANEXOS .....</b>	<b>85</b>
7.1. ESPECTROS DE RMN <sup>1</sup> H.....	85
7.1. ESPECTROS DE RMN <sup>13</sup> C .....	87
7.3. COMITÊ DE ÉTICA .....	89

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. FLOROGLUCINOL E COMPOSTOS FENÓLICOS

---

Compostos fenólicos naturais são metabolitos secundários de plantas e muitos deles são encontrados nos alimentos. Mais de 10.000 compostos polifenóis foram identificados em várias plantas, constituindo o terceiro grupo mais relevante de metabólitos secundários, podendo ser divididos em diferentes grupos pelo número de anéis de fenol que eles contêm e com base em elementos estruturais que ligam estes anéis, tais como os ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas. Como exemplo, temos o floroglucinol **1** (1,3,5-triidroxibenzeno), uma molécula com padrão de substituição simétrico. Seus derivados biossintéticos estão presentes em diversas famílias, como Myrtaceae, Guttiferae, Euphorbiaceae, Compositae, Rutaceae, Rosaceae, Clusiaceae (SINGH E BHARATE, 2006).

Descreve-se que o primeiro isolamento do floroglucinol foi obtido a partir de *Eucalyptuskinoe Acaciaarabica*, bem como a partir de algas marinhas pertencentes às famílias Phaeophyceae e Fucaceae (GLOMBITZA *et al.*, 1973). Este tem sido utilizado como um reagente para a detecção de aldeídos e também em tingimento de tecidos. Derivados do floroglucinol são uma importante classe de metabólitos secundários de ampla ocorrência na família Myrtaceae, além de serem relatados em fontes marinhas e microbianas. A presença de um grande e diverso número de estruturas aciladas tem sido relatada entre as plantas (SINGH E BHARATE, 2006).

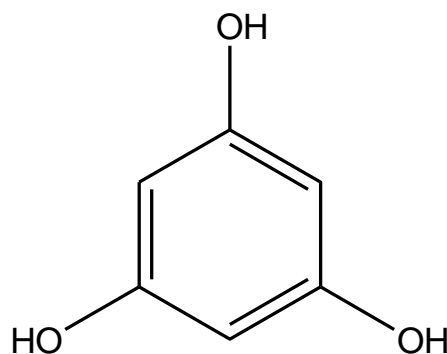


FIGURA 1: Estrutura do floroglucinol **1**.

O gênero *Hypericum*, pertencente à família Clusiaceae, engloba mais de 450 espécies (CRISPIN E WURTELE, 2013). A espécie *Hypericum perforatum* (Erva-De-São-João) é comumente usado por seres humanos medicinalmente (ERNST 2003, BIRT *et al.*, 2009). A hiperforina, quantitativamente o principal constituinte presente no *Hypericum* (2,0 – 4,5%), é, evidentemente, o acilfloroglucinol que recebeu mais atenção nos estudos farmacológicos (BEERHUES, 2006), e hoje, muitas vezes, é considerado o constituinte mais importante para atividade antidepressiva (CHATTERJEE *et al.*, 1998; MÜLLER, 2003; CARPENTER, 2011). A hiperforina é um acilfloroglucinol capaz de inibir a captação sinaptossômica de dopamina, serotonina e norepinefrina. No entanto, não se ligam a qualquer um desses sítios de transportadores neuronais de monoamina, apresentando, assim, um novo mecanismo de ação, diferente dos atuais tratamentos farmacológicos para transtornos depressivos (do REGO *et al.*, 2007; CCANA-CCAPATINTA *et al.*, 2014).

Outro derivado do floroglucionol, a Uliginosina B **5**, foi extraída de espécies nativas do Rio Grande do Sul (*H. myrianthum* e *H. carinatum*) e é responsável pela atividade antidepressiva de *H. polyanthum* (RATES *et al.*, 2010), sendo também isolado de *H. uliginosum*, juntamente com a uliginosina A **4** (ABREU *et al.*, 2004). Stein e colaboradores (2012) descreveram que a uliginosina B **5** representa uma molécula com ação não-seletiva sobre o sistema monoaminérgico, inibindo a recaptação das monoaminas sem se ligar aos respectivos transportadores, o que pode representar um novo composto com inibição tripla da recaptação. Além disso, essa inibição pode estar relacionada a uma alteração do gradiente iônico de Na<sup>+</sup> através da estimulação da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (STEIN *et al.*, 2012).

Os derivados do floroglucinol, além de isolados de plantas, também têm sido sintetizados ao longo dos anos. Para obtenção das mais diversas estruturas (aciladas, isopreniladas, com adutosterpênicos, glicosídicas, diméricas, triméricas, halogenadas, flortaninos), muitos esquemas de síntese são utilizados. Como exemplo, Yuste e colaboradores (YUSTE *et al.*, 1978) realizaram a primeira síntese do grandinol **3**, um derivado acilado do floroglucinol, em três etapas, partindo do 2,4,6-trinitrotolueno. Este composto é reduzido, na presença de estanho e ácido clorídrico, a 2,4,6-triidroxitolueno e



acilado através de Friedel Crafts com cloreto de isovalerila e tetracloreto de titânio, sendo formilado na última etapa, na presença de éter diclorometil metílico e tetracloreto de titânio como catalisador para obter o grandinol com 1,8% de rendimento global. Já Yoshida e colaboradores (YOSHIDA *et al.*, 1985), iniciou com a acilação do floroglucinol na presença de cloreto de isovalerila, formando o composto floroisovalerofenona, seguida de uma formilação na presença de ortofomato de trietila gerando o composto intermediário que é metilado na presença de iodometano em meio básico, obtendo-se o grandinol com 12% de rendimento.

A síntese total de compostos diméricos como as uliginosinas A 4 e B 5 também já estão descritas na literatura, primeiramente com Kuhnke e Bohlmann em 1985 (KUHNKE E BOHLMANN, 1985) e mais recentemente em 2012, onde Kraus e Liu obtiveram estas estruturas com rendimentos em torno de 60%. (KRAUS E LIU, 2012).

Nosso grupo de pesquisa no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica vêm desenvolvendo há alguns anos a síntese de derivados do floroglucinol visando à atividade antidepressiva. Os compostos foram planejados utilizando a uliginosina B 5 como protótipo e originou uma série de estruturas aciladas, isopreniladas, metiladas, além de dímeros. Destes derivados, alguns foram testados no ensaio de suspensão pela cauda em camundongos demonstrando bons resultados (DUARTE *et al.*, 2014).

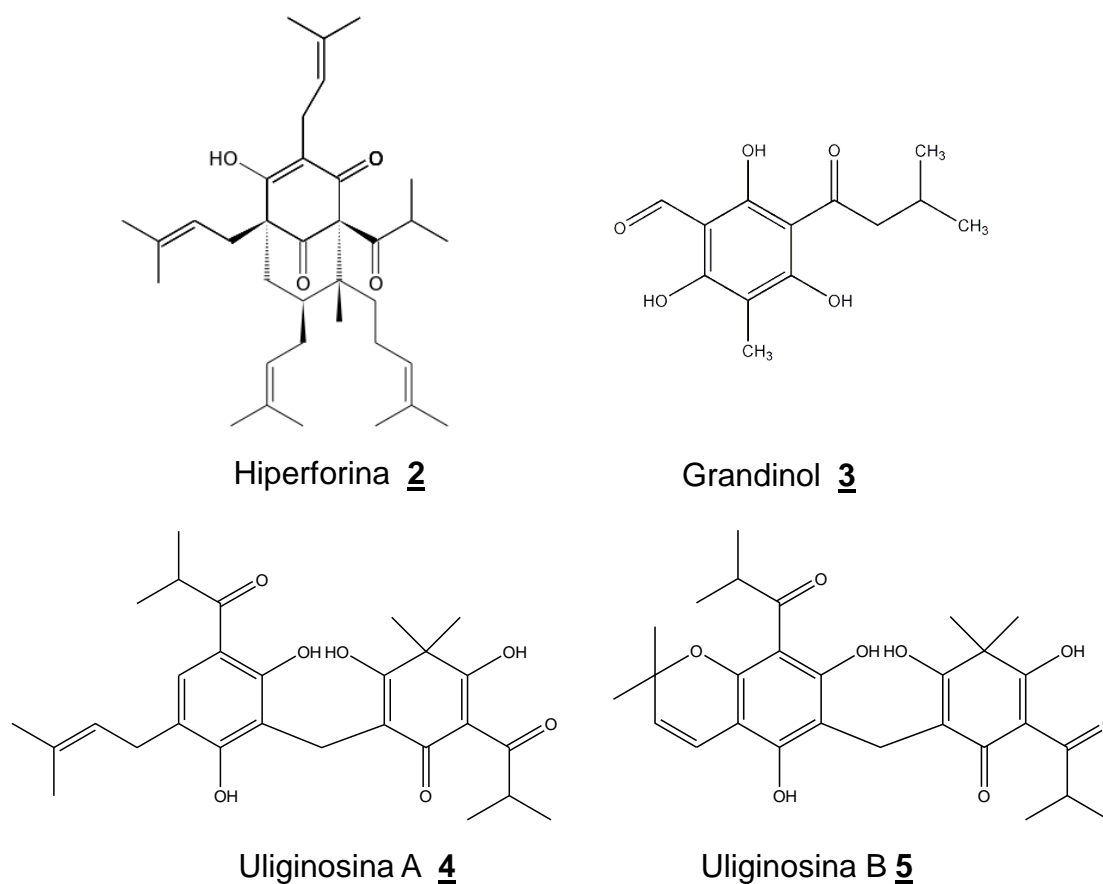


FIGURA 2: Derivados do floroglucinol.

## 1.2. EPILIPESIA E CONVULSÃO

Dentre as doenças que envolvem o sistema nervoso central (SNC), as epilepsias se destacam por serem patologias crônicas e sem tratamento curativo, conhecidas desde os tempos mais remotos, quando a origem da doença era atribuída aos espíritos malignos. Sua prevalência é de 1% da população do mundo, e a cada ano somam-se aproximadamente três milhões de novos casos (OMS, 2013). O evento característico da epilepsia são as crises convulsivas recorrentes, que estão associadas à uma descarga episódica de alta frequência de impulsos por um grupo de neurônios no cérebro (AVOLI *et al.*, 2005; PITKANEN *et al.*, 2009). É uma condição crônica que pode ter importantes repercussões psicossociais. São comuns os casos de distúrbios de aprendizado e transtornos psiquiátricos associados, estimando-se que aproximadamente 50% das crianças epiléticas têm alguma dificuldade na escola.

O local da descarga primária e a extensão de sua propagação é que determinam os sintomas, que vão desde um breve lapso de atenção até uma crise convulsiva completa, que pode durar vários minutos (FISCHER *et al.*, 2005, ENGEL *et al.*, 2006). As crises epiléticas estão sempre relacionadas com descargas anormais e excessivas a nível cerebral, podendo ser registadas através de um electroencefalograma (EEG) (Fischer *et al.*, 2005), sendo que essa hiperatividade neuronal de duração variável pode estar restrita a uma determinada área cerebral ou então propagar-se e estender-se pelas áreas vizinhas. A sua frequência pode variar de menos de uma por ano para várias vezes por dia. Em pacientes epiléticos, as crises convulsivas podem ser periódicas, crônicas e repetitivas, já em casos eventuais, pode ocorrer devido a fatores simples ou graves como febre, enxaqueca, hipóxia cerebral, tumores, intoxicações, infecções, reação a medicamentos, alterações metabólicas, entre outros (PATIDAR *et al.*, 2013). Algumas vezes, os termos crise convulsiva e convulsão são erroneamente considerados sinônimo de epilepsia, porém cerca de 10% da população tem pelo menos um episódio de convulsão durante a vida. São necessários pelo menos dois episódios de convulsão, não provocadas pelas causas citadas anteriormente, além de outros sintomas, para poder diagnosticar a convulsão como uma doença (epilepsia) (KORFF E SCHEFFER, 2013).

Os tipos de convulsão são organizados, primeiramente, de acordo com a fonte da convulsão dentro do cérebro, podendo ser localizadas (crises parciais ou focais) ou mais disseminadas (crises generalizadas). As crises parciais são divididas na medida em que consciência é afetada. Se não há prejuízo da consciência, então é uma crise parcial simples; caso contrário, é uma crise parcial complexa (psicomotora). As crises generalizadas são divididas de acordo com o efeito sobre o corpo, mas todos envolvem perda de consciência podendo ser, por exemplo, tônico-clônica, clônica, crise de ausência, entre outras (SCHEFFER *et al.*, 2014).

Apesar da introdução na terapêutica de muitos medicamentos antiepiléticos nas últimas duas décadas, a proporção de indivíduos com epilepsia fármaco-resistente não foi substancialmente reduzida em comparação com a década de 1960. Todos os fármacos disponíveis atualmente também têm limitações em termos de efeitos adversos e de susceptibilidade às

interações medicamentosas (PERUCCA E FATTORE, 2011). Faz-se necessário, portanto, mais esforços em pesquisa para conduzir um desenvolvimento racional de novas terapias.

### 1.3. SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

---

A transmissão sináptica, processo pelo qual os neurônios se comunicam com as células alvo, é essencial para todos os processos neuronais e é comumente mediada pela liberação de mensageiros químicos (neurotransmissores) de neurônio pré-sináptico e posterior reconhecimento destes por receptores específicos nas células pós-sinápticas apropriadas. Quando os terminais pré-sinápticos recebem um potencial de ação, ocorre a despolarização da membrana sináptica, gerando influxo de íons sódio através dos canais de sódio sensíveis a voltagem (NICHOLLS *et al.*, 1990). Posteriormente, ocorre a liberação de glutamato das vesículas para a fenda sináptica, por exocitose (BENNETT *et al.*, 1999).

O glutamato é o aminoácido livre mais abundante no SNC de mamíferos e um precursor imediato do GABA em neurônios inibitórios e de glutamina em astrócitos (DANBOLT, 2001; CHO, 2013), sendo o principal neurotransmissor excitatório de mamíferos e participando em diversas funções cerebrais como cognição, aprendizado e memória e plasticidade neural (COLLINGRIDGE *et al.*, 2004). Os receptores de glutamato podem ser divididos em duas classes: receptores ionotrópicos e receptores metabotrópicos (RYVLIN E RHEIMS, 2013).

Os receptores ionotrópicos (iGluR) são canais iônicos que medeiam a passagem de cátions específicos, e sua ativação promove a despolarização da membrana sináptica, desencadeando uma resposta excitatória. Estes se subdividem em N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionico (AMPA) e ácido caínico (KA). Todos os subtipos de receptores são ativados por glutamato, porém cada um é ativado seletivamente por um agente agonista diferente (OZAWA *et al.*, 1998, NOEBELS *et al.*, 2012).

Os receptores metabotrópicos (mGluR) exercem sua função através do recrutamento e ativação de proteínas ligantes de nucleotídeos da guanina

(proteína G) e modulam a atividade de efetores intracelulares, como a adenilatociclase e fosfolipase C (PIN E DUVOISIN, 1995), responsáveis pela produção de segundos-mensageiros (AMP-cíclico, diacilglicerol e inositol-3-fosfato), os quais ativam e/ou inibem diversos eventos de sinalização celular. Os receptores metabotrópicos estão presentes em ambos os terminais pré- e pós-sináptico, bem como nas células gliais, e sua ativação pode promover efeitos inibitórios ou excitatórios. Até o momento, oito subtipos de mGluR foram identificados (mGluR1-8), os quais são ainda subdivididos em três grupos funcionais com base na homologia de aminoácidos, ligação à agonista e ativação de cascatas de transdução de sinal (NICIU *et al.*, 2012).

Uma vez liberado, o glutamato exerce sua ação excitatória e o término da neurotransmissão ocorre através da remoção por um processo de captação, já que não há mecanismos enzimáticos que degradem este neurotransmissor na fenda. (DANBOLT, 2001). As células astrocíticas são as principais responsáveis por essa remoção agindo através de um sistema de alta afinidade dependente de sódio (ANDERSON E SWANSON, 2000).

A regulação dos níveis de glutamato no SNC é exercida pelos astrócitos e tem importância fundamental para o correto funcionamento neuronal, sendo que uma concentração exacerbada de glutamato na fenda sináptica envolve risco de neurotoxicidade (SIDORYK-WEGRZYNOWICZ E ASCHNER, 2013). Essa situação tem sido relacionada a diversas doenças agudas e crônicas do SNC, tais como isquemia, hipóxia e trauma, Alzheimer e epilepsia (LAI *et al.*, 2013).

#### 1.4. FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES

---

O controle das crises epiléticas vem progredindo durante os anos, não só em decorrência do aparecimento de novos fármacos, mas também com a possibilidade de monitoramento sérico dos tratamentos, auxiliando a terapia de maneira mais exclusiva para o paciente. Para o tratamento, adota-se a monoterapia, por sua maior tolerabilidade e adesão. A dose pode variar ao longo da fase de adaptação, até que se consiga controlar as crises sem o risco de toxicidade. Segundo a The International League Against Epilepsy (ILAE), a

terapêutica farmacológica é ineficaz em um terço dos casos, caracterizando os pacientes refratários.

Para conter a despolarização da crise, o necessário é que se module a excitação e a inibição da membrana celular dos neurônios. Dessa forma, numerosos mecanismos têm sido propostos para ação dos fármacos antiepiléticos, mas, de maneira geral, estes atuam principalmente de três formas: limitação dos disparos neuronais repetitivos através do bloqueio de canais iônicos dependentes de voltagem, incremento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA e bloqueio da transmissão glutamatérgica excitatória (DECKERS *et al.*, 2003; ROGAWSKI E LOSHER, 2004; NAKKEN *et al.*, 2014).

O brometo de potássio foi o primeiro fármaco antiepilético conhecido (1957, Inglaterra), constituindo a sua utilização o início do tratamento da epilepsia (BRODIE, 2010). Contudo, a terapia antiepilética começou de fato com a descoberta do fenobarbital, por Alfred Hauptmann, e posteriormente surgiu a fenitoína, utilizados até hoje. Durante os anos 60, os laboratórios Roche reconhecem as propriedades antiepiléticas das benzodiazepinas por eles sintetizadas (BRODIE, 2010). Ao longo dos anos muitos fármacos foram introduzidos no mercado mundial, entre eles o valproato de sódio, vigabatrina, oxcarbazepina, topiramato, gabapentina, entre outros (MELDRUM E ROGAWSKI, 2007). Todas estas substâncias possuem mecanismos de ação distintos, ou uma combinação de vários mecanismos de ação, mas têm em comum o fato de reduzirem a atividade excitatória neuronal ou de aumentar a inibição da atividade neuronal (BRODIE, 2010).

O conhecimento dos mecanismos de ação e da farmacocinética dos fármacos antiepiléticos é muito importante, visto que são muitas as estruturas e sistemas do organismo que estão envolvidos durante uma crise epilética, como os neurônios, os canais iônicos, receptores, células da glia e sinapses inibitórias e excitatórias. Assim, os fármacos antiepiléticos foram desenvolvidos com o propósito de modificar estes processos no sentido de favorecer a inibição da função excitatória, com a finalidade de evitar e prevenir as crises epiléticas. Como exemplos de mecanismos dos medicamentos já utilizados na terapêutica, podemos citar: bloqueadores dos canais de sódio dependentes de voltagem (carbamazepina, fenitoína, oxcarbazepina),

agonistas do receptor GABAA (fenobarbital), interferência da excitação mediada pelo glutamato e bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem (valproato), entre outros (BRODIE *et al.*, 2011).

Medicamentos que atenuam a neurotransmissão excitatória, tais como bloqueadores dos receptores glutamatérgicos têm sido propostos como potenciais agentes anticonvulsivantes (KWAN *et al.*, 2001; JEFFERYS, 2010). Partindo do reconhecimento de que a epilepsia é uma doença de difícil controle porque a terapia nem sempre é bem sucedida, novos conceitos e direcionamentos têm sido buscados pelos pesquisadores no desenvolvimento de novas drogas antiepiléticas.

### 1.5. ZEBRAFISH

---

O *zebrafish*, ou “paulistinha”, é um pequeno teleóstio que mede de 3 a 4 cm, tem peso em torno de 0,35 g e pertence à família Cyprinidae. Como um vertebrado relativamente simples, o *zebrafish* é fisiologicamente homólogo aos seres humanos, permitindo aos pesquisadores investigar os caminhos e mecanismos relevantes para a patogênese humana e tratamentos clínicos (SHIN *et al.*, 2002). Ao longo dos últimos quinze anos, o *zebrafish* tem emergido como um poderoso modelo animal para a genética molecular e análise de desenvolvimento farmacológico, fisiológico e patológico. O *zebrafish* tem sido aplicado como modelo em estudos de genética, desenvolvimento, teratologia, toxicologia, neurociências (VASCOTTO, 1997), comportamento (ROSEMBERG *et al.*, 2011), além de modelos convulsivos (MUSSULINI *et al.*, 2013), tornando-se foco de estudos neurocomportamentais pois apresenta fenótipos neuropatológicos e comportamentais que são quantificáveis (SANTANA *et al.*, 2012).

Ao ambiente aquático do *zebrafish*, produtos químicos são facilmente adicionados gerando intervenções farmacológicas, as quais podem ser monitoradas e gravadas para uma análise comportamental precisa e detalhada. Estas características biológicas, juntamente com as ferramentas e tecnologias disponíveis para o modelo em *zebrafish*, permitem poderosas abordagens para investigar o desenvolvimento do sistema nervoso, fisiologia e processos de doença, bem como para facilitar a descoberta de novas drogas terapêuticas

(WOLMAN *et al.*, 2012). A exposição de embriões de *zebrafish*, larvas ou adultos a agentes convulsivos químicos clássicos como o pentilenotetrazol (PTZ), inibidor do receptor GABAA, induz rapidamente convulsões altamente semelhantes às provocadas por crises epilépticas em fatias de cérebro de roedores e em pacientes humanos com epilepsia (BAXENDALE *et al.*, 2012).

Estudos em *zebrafish* adultos confirmam que o tratamento PTZ induz espasmos, crises de hiperatividade, bem como o comportamento de natação circular, acompanhadas por um grande aumento nos níveis de cortisol no soro, sendo consistente com a indução de crises convulsivas (BARABAN *et al.*, 2005; HORTOPAN *et al.*, 2010; MUSSULINI *et al.*, 2013). Além disso, uma técnica de eletroencefalografia foi desenvolvida para monitoramento de convulsões induzidas por PTZ em *zebrafish* adulto. Esta demonstrou que a administração de anticonvulsivantes conhecidos suprime de forma eficiente as convulsões e descargas elétricas em embriões e larvas tratados, ressaltando ainda mais a similaridade das crises convulsivas em *zebrafish* com aqueles em roedores e humanos (WONG *et al.*, 2010).

O pequeno espaço requerido para a manutenção dos animais, o baixo custo e a praticidade para reprodução em larga escala (LIESCHKE E CURRIE, 2007) são algumas das características que tornam o *zebrafish* atraente nas pesquisas científicas. Desta forma, pode-se acelerar a descoberta de novos compostos que possam servir como estratégia terapêutica (STERN *et al.*, 2003).



FIGURA 3: *Zebrafish* adulto.

---

#### 1.6. TESTES DE TOXICIDADE: MTT E LDH

Uma variedade de compostos de tetrazólicos tem sido utilizada para detectar células viáveis. O ensaio colorimétrico MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um método estabelecido para



determinar o número de células viáveis em estudos de proliferação e de citotoxicidade. Este ensaio baseia-se na clivagem do sal de tetrazólio amarelo, MTT, para formar um produto formazânico púrpura, por enzimas mitocondriais, onde a quantidade produzida é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes durante a exposição ao MTT. Uma vez que o ensaio MTT é rápido, conveniente e econômico, torna-se uma técnica muito popular para a quantificação das células viáveis *in vitro* (SYLVERTER, 2011).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima presente numa grande variedade de organismos, incluindo animais e plantas. O ensaio de LDH foi originalmente proposto visando à medida da morte celular necrótica (KOH e CHOI, 1987), uma vez que essa enzima citosólica é liberada por células destruídas ou que sofreram danos após insulto (LOBNER, 2000). Essa atividade enzimática pode ser determinada tanto através da medida espectrofotométrica da oxidação do NADH na presença de piruvato (SOBRADO *et al.*, 2004) como na redução do NAD, com subsequente conversão de lactato em piruvato (FONTELLA *et al.*, 2005) e demonstra ser um método simples e seguro para investigação de viabilidade. Esse evento é possível devido ao fato da lactato desidrogenase ser uma enzima que catalisa uma reação reversível, isto é, a interconversão entre lactato e piruvato, com participação de NAD como coenzima celular (MOZES *et al.*, 2012).

## 1.7. ESTADO DA ARTE

---

Acilfloroglucinóis compreendem o maior grupo de compostos naturais derivados do floroglucinol, e mais de 100 estruturas aciladas têm sido relatados. Estes incluem mono, di e tri-éteres acilados com variados graus de substituição podendo ser cadeias lineares ou ramificadas. Devido à vasta gama de atividades biológicas apresentadas por estes compostos, numerosos grupos de pesquisa têm se esforçado para sintetizar estes compostos. Podemos descrever as três estratégias básicas envolvidos na síntese de acilfloroglucinóis que são: (I) acilação utilizando cloretos de acila, anidridos, nitrilas de alquila e ocasionalmente ácidos carboxílicos, (II) mono-, di- ou tri-O-alquilação de floroglucinol com diazometano, sulfato de dimetila, iodeto metano, etc, e (III)

mono ou di-C-alquilação (metilação na maioria das vezes) com sulfato de dimetila, iodeto de alquilo ou brometo, na presença de uma base. A estratégia geral para a síntese desta classe de compostos inclui a acilação de Friedel-Crafts utilizando cloretos de acila / anidridos ou a reação de Houben-Hoesch utilizando alquilnitrilos como agentes de acilação (SINGH *et al.*, 2009).

Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, sete derivados do floroglucinol foram testados quanto aos efeitos antidepressivos por meio do teste de suspensão da cauda (TSC) em camundongos. Estruturas contendo grupamento acila, diminuíram a imobilidade dos animais tratados com doses equimolares de imipramina (20 mg/kg), sem manifestarem alterações na atividade locomotora, avaliada pelo teste de campo aberto. Estes derivados podem ser um novo modelo molecular na busca de medicamentos antidepressivos (DUARTE *et al.*, 2014).

Durante alguns anos, estudos sugeriram que os medicamentos antidepressivos possuíam propriedades pró-convulsivantes (JOBE E BROWNING *et al.*, 2005). Mais recentemente, houve evidências do papel anticonvulsivante para os antidepressivos mais seletivos, de nova geração (KANNER *et al.*, 2009; BAGDY *et al.*, 2007). Specchio e colaboradores (2004) descreveram que o citalopram, um antidepressivo comumente utilizado, mostrou-se eficaz como anticonvulsivante. Essa correlação também já foi verificada para a fluoxetina (FAVALE *et al.*, 1995; CARDAMONE, 2012) e outros medicamentos que atuam na recaptção de serotonina (EPPS *et al.*, 2013). Com base nesses dados, torna-se de grande interesse a pesquisa do potencial de atividade anticonvulsivante de compostos derivados do floroglucinol. As convulsões, em geral, causam comprometimento transitório da consciência, expondo o indivíduo a riscos de lesões físicas e freqüentemente interferindo na educação e no trabalho. Embora existam muitos tratamentos disponíveis, há muito empenho na busca de novas abordagens terapêuticas devido ao grande percentual de pacientes refratários e, ainda, aos efeitos adversos e toxicidade que comprometem a adesão do paciente. O conhecimento do mecanismo de ação do fármaco, e também a descoberta de novas moléculas, é de grande importância, não só para o uso racional adequado e consciente do mesmo, mas também para a elucidação de

fenômenos fisiológicos e bioquímicos nos diversos níveis da estrutura do organismo.



## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. OBJETIVO GERAL

---

- Investigar a ação anticonvulsivante e possíveis mecanismos de ação do floroglucinol e derivados sintéticos através da avaliação do efeito destes no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em zebrafish adulto.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- Sintetizar derivados do floroglucinol através da química orgânica clássica;
- Investigar a ação de floroglucinol e derivados no perfil comportamental de *zebrafish*;
- Avaliar os efeitos do floroglucinol e seus derivados sobre crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol em *zebrafish* através do estudo de: tempo de latência para crise convulsiva; frequência acumulada da convulsão; perfil convulsivo; intensidade da convulsão.
- Investigar a ação do floroglucinol e derivados sintéticos sobre a captação de glutamato em cérebro de *zebrafish*.
- Avaliar a toxicidade do floroglucinol e derivados sintéticos em cérebro de *zebrafish* através do método de MTT e LDH.



## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 3.1. PARTE QUÍMICA

#### 3.1.1. GERAL

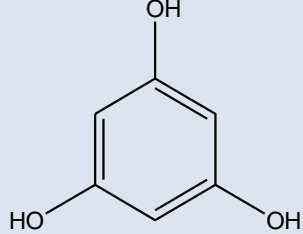
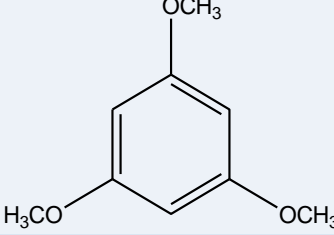
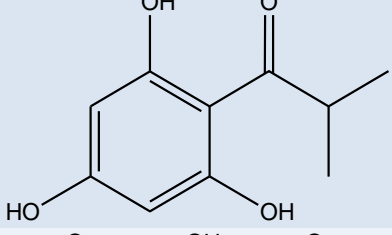
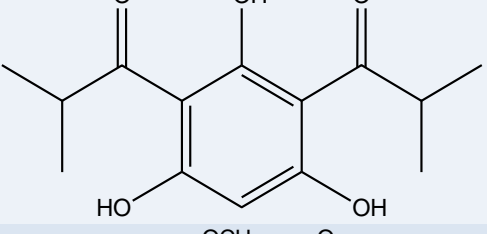
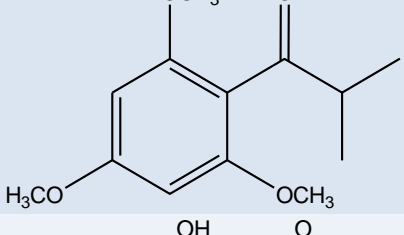
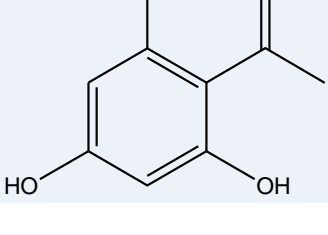
---

Os produtos químicos e reagentes foram adquiridos a partir de fornecedores comerciais e utilizados conforme indicação do fabricante. A síntese foi desenvolvida no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica desta Universidade, sob o uso de equipamento de proteção pessoal, sempre em capela de fluxo para minimizar toxicidade e evitar qualquer possível risco. Todos os solventes utilizados possuíam grau AR e foram destilados com pressão positiva de nitrogênio quando necessário. As reações que requereram condições anidras foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio. As reações foram monitoradas por cromatografia de camada delgada (CCD) em folhas de alumínio de sílica gel (Merck™) e visualizados por pulverização com reagente anisaldeído sulfúrico e aquecimento. A evaporação e concentração dos solventes foram feitas no evaporador rotativo Büchi utilizando bomba de vácuo. Os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN foram medidos em equipamento Varian® 400 MHz e/ou 60 MHz. Os deslocamentos químicos estão apresentados como  $\delta$  (ppm). O solvente deuterado utilizado foi acetona. Os espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de alta resolução Q-ToF micro Waters, operando em modo de ionização electrospray. Cromatografia em coluna foi realizada utilizando matriz de gel de sílica 60 (35–70  $\mu\text{m}$ ) e a cromatografia em camada delgada preparativa foi realizada em placas de vidro (20x20 cm) com gel de sílica 60GF<sub>254</sub>.

Os produtos de partida floroglucinol **1** e floroglucinoltrimetoxilado **6** foram adquiridos comercialmente na forma anidra da marca Sigma Aldrich™.

### 3.1.2. SÍNTESE DOS DERIVADOS DE FLOROGLUCINOL

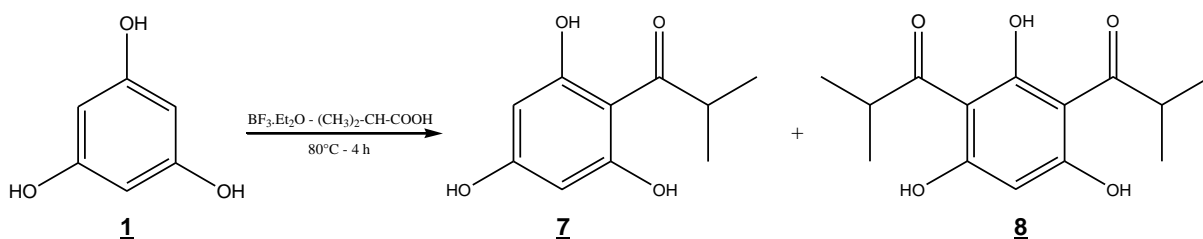
TABELA 1: Numeração, nomenclatura e estrutura dos compostos sintetizados.

Número	Nome	Estrutura
1	Floroglucinol (1,3,5-triidroxibenzeno)	
6	Floroglucinoltrimetoxilado (1,3,5-trimetoxibenzeno)	
7	2-metil-1-(2,4,6-triidroxifenil)propan-1-ona	
8	2-metil-1-[2,4,6-triidroxi-3-(2-metilpropanoil)fenil]propan-1-ona	
9	2-metil-1-(2,4,6-trimetoxifenil)propan-1-ona	
10	1-(2,4,6-triidroxifenil)etan-1-ona	



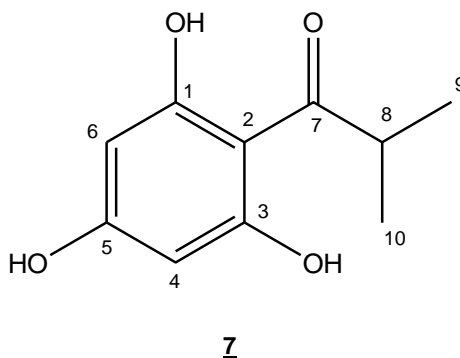
### 3.1.2.1. SÍNTESE DE **2-METIL-1-(2,4,6-TRIIDROXIFENIL)PROPAN-1-ONA (7)** E **2-METIL-1-[2,4,6-TRIIDROXI-3-(2-METILPROPANOIL)FENIL]PROPAN-1-ONA (8)**

A uma mistura de ácido isobutírico (338 mg, 4,8 eq) e eterato de  $\text{BF}_3$  40% (0,46 g, 4,1 eq.) foi adicionado o floroglucinol (100 mg, 0,79 mmol), em atmosfera inerte e temperatura ambiente. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura de  $80^\circ\text{C}$  por quatro horas. O resíduo obtido forneceu os dois produtos - monoacilado e diacilado. O meio reacional foi tratado com HCl 4M até pH ácido. A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL) e a fase orgânica foi levada à secura em evaporador rotatório. Os dois compostos foram isolados utilizando dois métodos cromatográficos: por placa preparativa usando cicloexano e acetato de etila (1:1) como eluente ou coluna cromatográfica com crescente aumento da polaridade nos mesmos solventes.



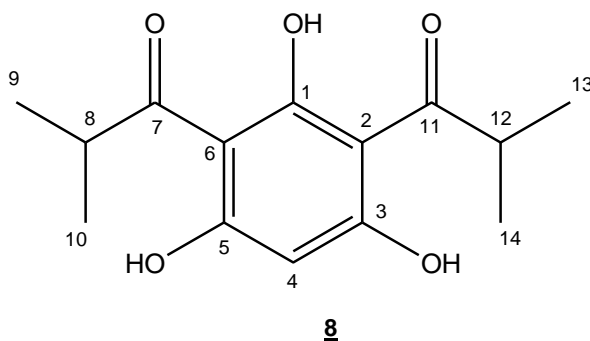
Esquema 1: Obtenção dos compostos **7** e **8**.

Foram obtidos os dois produtos de interesse: 85,9 mg de um óleo rosado correspondente ao **2-metil-1-(2,4,6-triidroxifenil)propan-1-ona (7)** com 55% de rendimento. E 52,9 mg de um sólido amarelado correspondente ao **2-metil-1-[2,4,6-triidroxi-3-(2-metilpropanoil)fenil] propan-1-ona (8)** com 25% de rendimento.



$^1\text{H}$  RMN (60 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 1,61 (H9, H10, 6H, d,  $J= 6,7$  Hz), 4,44 (H8, 1H, m), 6,36 (H4, H6, 2H, brs), 9,68 (2 OH), 12,13 (OH).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 18,7 (C9, C10), 38,5 (C8), 95,1 (C4, C6), 103,5 (C2), 164,7 (C1, C3, C5), 209,6 (C7).

HRMS (ESI-MS, m/z):  $[\text{M}]^+$  calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ : 197,0814; encontrada: 197,0821.

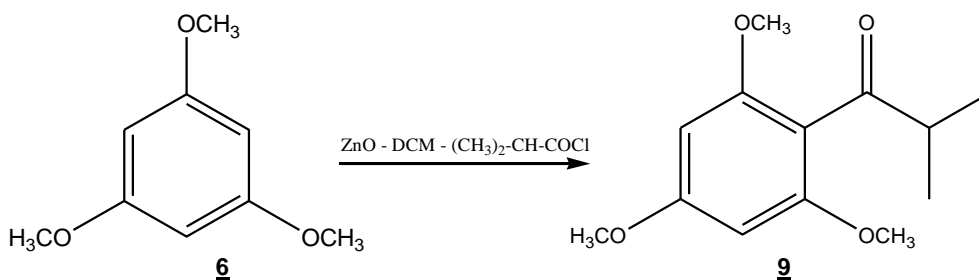


$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 1,16 (H9, H10, H13, H14, 12H, d,  $J= 6,8$  Hz), 3,99 (H8, H12, 2H, m), 5,96 (H4, 1H, s).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 18,6 (C9, C10, C13, C14), 38,6 (C8, C12), 95,0 (C4), 103,3 (C2, C6), 164,2 (C1), 164,5 (C3, C5), 209,8 (C7, C11).

HRMS (ESI-MS, m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{O}_5$ : 267,1232; encontrada: 267,1235.

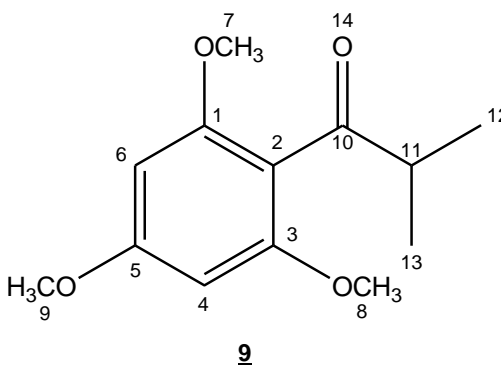
### 3.1.2.2. SÍNTESE DE 2-METIL-1-(2,4,6-TRIMETOXIFENIL)PROPAN-1-ONA (9)

À mistura de floroglucinol trimetoxilado (trimetoxibenzeno) (50 mg, 0,3 eq) e óxido de zinco (0,3 mmol, 1 eq) foi adicionado diclorometano (DCM) seco. Após, acrescentou-se cloreto de isobutirila (0,3 mmol, 1 eq) à temperatura ambiente. A reação foi encerrada 24 horas depois, filtrando-se o óxido de zinco. O filtrado foi evaporado em evaporador rotatório. O produto foi purificado por cromatografia em camada delgada preparativa, utilizando ciclohexano e acetato de etila (1:1) como eluente.



Esquema 2: Obtenção do composto **9**.

Foram obtidas 56,9 mg de um sólido brilhoso esbranquiado correspondente ao **2-metil-1-(2,4,6-trimetoxifenil)propan-1-ona (9)** com 80% de rendimento.



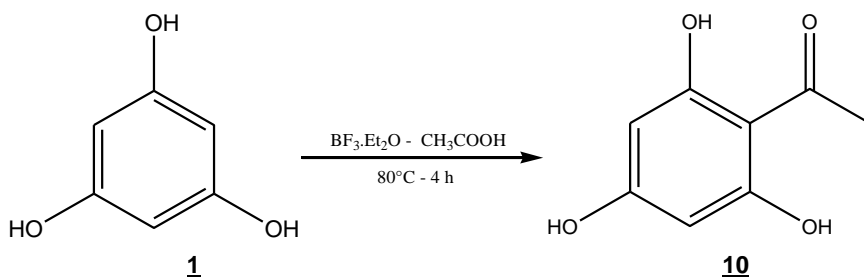
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 1,05 (H12, H13, d, 6H,  $J= 7,0$ ), 2,09 (H11, 1H,m), 3,77 (H7, H8, brs, 6H), 3,83 ppm (H9, s, 3H), 6,26 (H4, H6, 2H, s).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 17,1 (C12, C13), 41,6 (C11), 54,8 (C7, C8), 55,2(C9), 90,6 (C4,C6), 113,2 (C2),157,8 (C1, C3), 162,1(C5), 205.8 (C10).

HRMS (ESI-MS, m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_4$ : 239,1283; encontrada: 239,1288.

### 3.1.2.2. SÍNTESE DE **1-(2,4,6-TRIIDROXIFENIL)ETAN-1-ONA (10)**

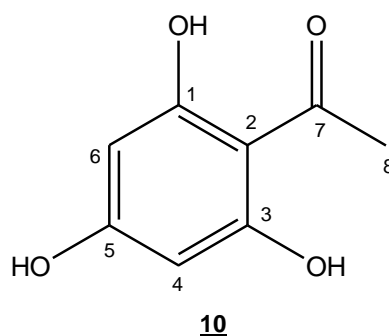
À mistura de ácido acético (105 mg, 6 eq) e eterato de  $\text{BF}_3$  - 40% (0.23 g, 4.1 eq.) foi adicionado o floroglucinol (50 mg, 0,39 mmol) em atmosfera inerte e temperatura ambiente. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura de  $80^\circ\text{C}$  por quatro horas. Este foi tratado com uma solução de acetato de sódio (4%). A fase aquosa foi extraída com acetato de etila (3 x 20 mL) e purificada por placa preparativa usando cicloexano e acetato de etila

(1:1) como eluente ou coluna cromatográfica com crescente aumento da polaridade dos mesmos solventes.



Esquema 3: Obtenção do composto **10**.

Foram obtidas 33 mg de um sólido rosado correspondente ao **1-(2,4,6-triidroxifenil)etan-1-ona (10)** com 50% de rendimento.



$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 2,59 (H8, 3H, s), 5,92 (H4, H6, 2H, brs).  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ): 31,8 (C8), 94,7 (C4, C6), 104,4 (C2), 164,5 (C1, C3), 164,4 (C5), 202,7 (C7).

HRMS (ESI-MS, m/z):  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculada para  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_4$ : 169,0500; encontrada: 169,1389.

## 3.2. PARTE BIOLÓGICA

### 3.2.1. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Todos os testes biológicos foram realizados no Laboratório 24 do Departamento de Bioquímica desta Universidade. Para o desenvolvimento dos testes, foram tomados todos os cuidados com segurança e ética.

### 3.2.2. ZEBRAFISH

---

*Zebrafish* adultos (3 a 6 meses de idade), de ambos os sexos, foram obtidos comercialmente (Delphis®, RS, Brasil) e passaram por processo de aclimação por 14 dias antes do início dos experimentos. Os animais foram mantidos em aquários de 40 L (com uma densidade de 2 animais/L). Tais aquários foram preenchidos com água condicionada com AquaSafe® (Tetra, VA, EUA) mantida sob aeração e a uma temperatura de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  a pH 7,2. A iluminação da sala foi fornecida por lâmpadas fluorescentes, sob um ciclo claro/escuro de 14/10 controlado por fotoperíodo (luzes acesas das 7 às 21 h). Os animais foram alimentados duas vezes por dia com ração comercial flocada (alconBASIC®, Alcon, Brasil). A água dos aquários era trocada duas vezes por semana e a qualidade da mesma foi monitorada utilizando kits comerciais para análise de pH, nitrito e amônia (Alcon BASIC®, Alcon, Brasil). A densidade de animais adotada esteve de acordo com o protocolo previamente descrito por Vargesson (2007) o qual verificou que uma quantidade de, no máximo, 5 animais por litro em sistemas com filtração constante, trocas de água periódicas e quantidade físico-química da água controlada não induz estresse e alterações comportamentais aos peixes.

Conforme descrito por Alfaro e colaboradores (2011), a fim de minimizar a dor e/ou o desconforto antes da administração dos tratamentos, os animais foram anestesiados previamente em solução de tricáina (160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Para a recuperação, os animais foram colocados em água normal aerada (ALFARO *et al.*, 2011). O protocolo de injeção intraperitoneal em *zebrafish* já foi previamente descrito, sendo que os animais não apresentam alterações locomotoras e/ou lesões aparentes após as injeções com volume fixado em 10  $\mu\text{L}$  (KINKEL *et al.*, 2010). De acordo com o Guia de Severidade de Procedimentos Científicos do CEUA-UFRGS este protocolo se enquadra no grau leve de severidade e foi aprovado sob o número 27006 (em anexo).

### 3.2.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES

---

Para a solubilização dos compostos utilizou-se água MilliQ e polissorbato 80 (Vetec®) na concentração de 5%, com auxílio de ultrassom.

Para os testes *in vivo*, as doses testadas foram de 6,0 mg/kg e 60 mg/kg.

Para os testes *in vitro*, utilizando estrutura cerebral de *zebrafish*, foram realizadas soluções de 0,2 mg/mL, 2 mg/mL e 20 mg/mL para cada composto (DUARTE *et al.*, 2013).

Uma solução contendo 5% de polissorbato 80 compôs o controle/veículo em todos os testes.

#### 3.2.4. APARATOS E PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

---

A fim de avaliar a locomoção/exploração do *zebrafish*, bem como comportamentos relacionados à resposta a novidade, realizou-se o teste de *open-tank*. A avaliação comportamental dos animais foi de acordo com o método previamente descrito (ROSEMBERG *et al.*, 2011). Os animais foram aleatoriamente retirados do aquário e transferidos, individualmente, para um confinamento cilíndrico contendo triclaína (160 µg/mL), onde permaneceram por aproximadamente um minuto, para anestesia. Posteriormente, procedeu-se a administração de 10 µL de cada solução mencionada anteriormente via intraperitoneal (i.p.). Após 10 minutos de recuperação da anestesia em béquer com água, cada animal foi cuidadosamente levado até o “open tank”, um tanque trapezoidal de vidro (23,9 x 28,9 x 15,1 cm e 15,9 cm de diagonal), conforme a figura 4A, contendo 1,5 L de água tratada com AquaSafe®. Os perfis comportamentais de cada animal foram observados e filmados durante dez minutos. As dimensões deste aparato são similares às previamente descritas para o teste de atividade locomotora e exploratória (ROSEMBERG *et al.*, 2011; WONG *et al.*, 2012). O *open tank* foi virtualmente dividido em três áreas horizontais iguais (fundo, meio e topo) para avaliar a atividade exploratória vertical, como demonstra a figura 4 (B). Posicionou-se uma webcam (Microsoft LifeCam® 1.1 com Auto-Focus) a 40 cm do open-tank para monitorar a localização e o nado dos animais. A câmera estava conectada a um computador para a gravação e análise dos vídeos, através do software ANY-Maze®, aplicando a tecnologia de video-tracking. Para uniformizar o ambiente de análise e aumentar o contraste do animal em relação ao aparato de teste, este foi cercado com papel amarelo (ROSEMBERG *et al.*, 2011).

Desta forma foi possível avaliar parâmetros como: distância percorrida, velocidade de nado, latência para entrada no topo, tempo de permanência no topo e tempo imóvel no aparato.

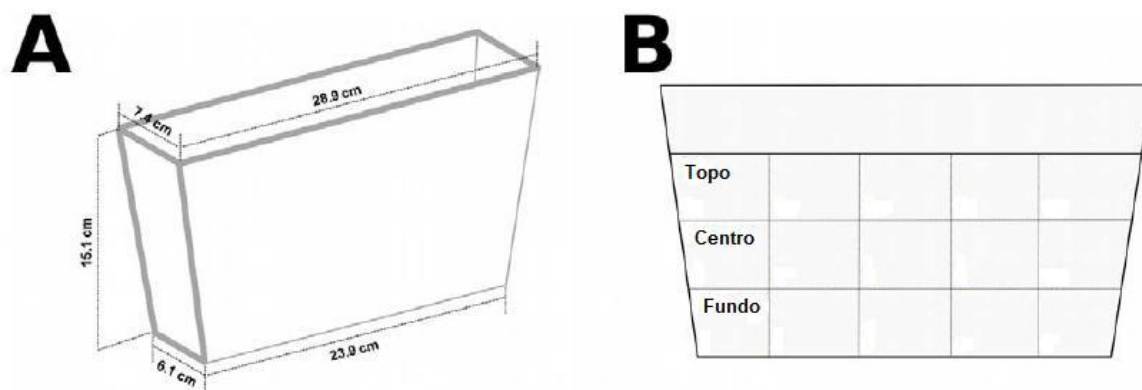


FIGURA 4: (A) Ilustração do tanque de vidro trapezoidal (*open tank*) e suas dimensões específicas. (B) Divisão virtual do tanque em três áreas (fundo centro e topo). Adaptado de Rosemberg *et al.*, 2011.

### 3.2.5. TESTE DE CONVULSÃO COM PENTILENOTETRAZOL

Cada animal, após passar pelo teste comportamental no *open tank*, foi transferido para um aquário contendo PTZ (10 mM; Sigma Aldrich<sup>TM</sup>) onde foi realizada a indução da convulsão. Durante vinte minutos o zebrafish foi filmado e observado. Dessa forma obtiveram-se os dados do tempo para ocorrer a primeira convulsão, perfil convulsivo, intensidade da crise e tempo necessário para o retorno ao nado normal após a indução da convulsão por PTZ. Posteriormente, os peixes foram transferidos para um béquer contendo 400 mL de água tratada (AquaSafe<sup>®</sup>) e observados por três horas a fim de obter o tempo necessário para o peixe voltar ao comportamento de nado normal. Este é definido como o tempo em que o peixe se encontra em escore 0 (nado curto, preferencialmente no fundo do aquário) e permanece deste modo até o final da observação (MUSSULINI *et al.*, 2013).

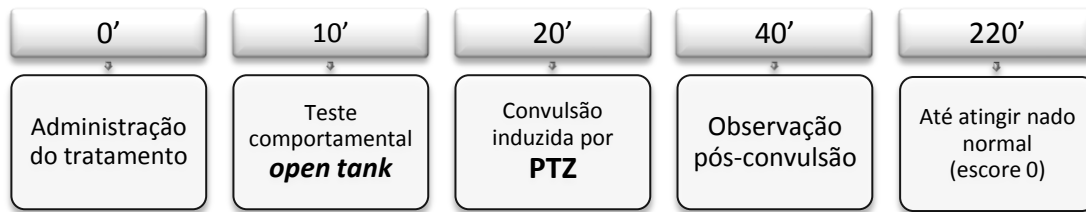


FIGURA 5: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO DELINEAMENTO EXPERIMENTAL EM *ZEBRAFISH* (COMPORTAMENTO SEGUIDO DE TESTE CONVULSIVO).

### 3.2.6. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA OS TESTES EM ESTRUTURA CEREBRAL DE *ZEBRAFISH*

Depois de serem crio-anestesiados, os peixes foram eutanasiados por de capitação para a retirada total do cérebro, o qual foi dissecado em placas de Petri umedificadas com solução salina balanceada de Hank (HBSS-tampão HEPES) que contém: 137 mMNaCl; 0,63 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3.0 mM NaHCO<sub>3</sub>; 5,36 mM KCl; 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,90 mM MgSO<sub>4</sub>; 5,55 mM glicose; e 20 mM HEPES, pH 7.2. Cada estrutura cerebral foi transferida para placas de 24 poços contendo 0,5 ml de tampão HBSS-HEPES. Todas as placas eram mantidas a 37°C durante todo o experimento.

### 3.2.7. CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO

Para a execução deste protocolo, utilizamos a totalidade da estrutura cerebral de peixe-zebra (telencéfalo, tecto óptico e cerebelo), de acordo com o protocolo previamente descrito por nosso grupo de pesquisa (RICO *et al.*, 2010), sendo avaliada a captação dependente de Na<sup>+</sup> a 37°C (meio HBSS-Hepes) e a captação não dependente de Na<sup>+</sup> (meio HBSS-Hepes com N-metil-D-glucamina). As amostras foram pré-incubadas por 30 minutos (15 min na ausência dos compostos e 15 min na presença dos compostos) antes da adição de 0,33 Ci/mL de L-[<sup>3</sup>H] glutamato em 100 μM de glutamato não radioativo. Após o período de incubação (5-7 minutos), as amostras foram duplamente lavadas com HBSS gelado e foi adicionado solução de NaOH 0,5 N para lise dos tecidos. O conteúdo intracelular de radioatividade foi determinado por cintilação e a captação específica calculada pela diferença da captação dependente de Na<sup>+</sup> da independente de Na<sup>+</sup> e expresso em nmol



H<sup>3</sup>/min/mg de proteína. Para a determinação da proteína total foi utilizado o método descrito por Peterson (1977).

### 3.2.8. TESTES DE TOXICIDADE: MTT E LDH

---

#### 3.2.8.1. MTT

A redução intracelular de MTT ao produto formazan púrpura pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase é considerado um indicador de viabilidade celular para determinar a citotoxicidade em amostras biológicas (WANG *et al.*, 2013). As estruturas cerebrais de *zebrafish* (n = 6 por grupo), após 15 ou 60 minutos de incubação com os compostos, foram imersas em solução 0,5 mg/ml de MTT, em placa de agitação a 37° C durante 20 min (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Em seguida, 300 µL de DMSO foram adicionados por estrutura e amostras de cérebro foram mantidas durante uma hora, protegidas da luz, sob agitação constante para garantir a solubilidade do formazan. O líquido extraído foi transferido a placas de 96 poços (200 µL por poço) e a viabilidade celular foi medida num leitor de microplacas a 560 e 650 nm. Os resultados foram expressos como uma percentagem em relação ao controle (estruturas cerebrais não tratadas).

#### 3.2.8.2. LDH

A quantidade de LDH liberada para o meio de incubação é um parâmetro que permite a avaliação de viabilidade celular (WANG *et al.*, 2012). A atividade da enzima LDH (CE 1.1.1.27) foi avaliada com kit comercial (Labtest®, Brasil). Após o período de incubação (15 ou 60 minutos) com os compostos, o meio foi removido e usado para a medição de atividade da LDH extracelular. Alíquotas de 100 µL, da mesma forma utilizada para o ensaio de MTT (n = 6 por grupo), foram transferidas para o meio de reação contendo: 7,5 mM NAD<sup>+</sup>, 260 mM de lactato e 1,6 mM de 1,10-fenantrolina. Seguindo a conversão de lactato em piruvato, 1,10-fenantrolina foi convertida de um complexo colorido por reação de NADH, a qual foi medida a 490 nm (FONTELLA *et al.*, 2005). Os resultados foram expressos como percentual da atividade de LDH total em cada estrutura cerebral. A atividade da LDH total foi

avaliada por lise mecânica completa de uma amostra independente e não tratada de estrutura cerebral.

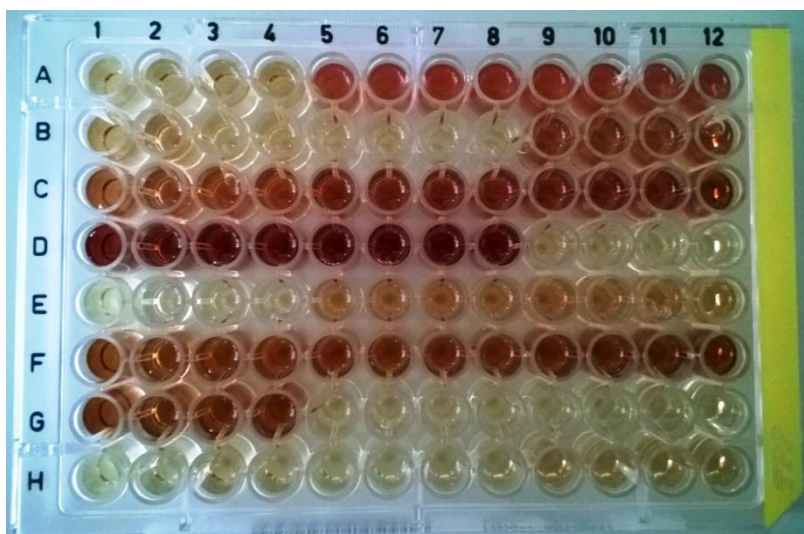


FIGURA 6: Placa de 96 poços no ensaio de dosagem da LDH.

### 3.2.8.3. Dosagem de proteínas

Após os ensaios bioquímicos, NaOH 0,5 N foi adicionada imediatamente às estruturas cerebrais. As amostras foram armazenadas durante a noite e a quantidade de proteína foi dosada (PETERSON *et al.*, 1977). Alíquotas de 10  $\mu$ L de proteína foram utilizadas para executar o ensaio, os quais foram misturados 90  $\mu$ L de água ultrapura e 100  $\mu$ L de reagente Lowry (CTC, 10% SDS, e 1 N NaOH). Após 10 minutos, o reagente de Folin-Ciocalteu (50  $\mu$ L, 0,4 N) foi adicionado ao meio de reação e incubado durante 30 min. O produto foi quantificado por espectrofotometria em 750 nm, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

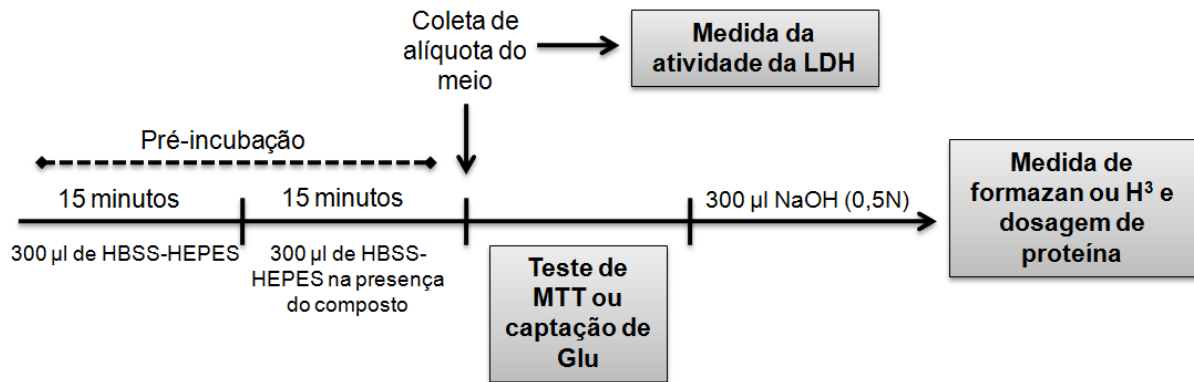


FIGURA 7: Representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação dos efeitos promovida pela exposição *in vitro* de floroglucinol e derivados em cérebro de *zebrafish*.

A figura 6 ilustra a representação esquemática da metodologia utilizada para a avaliação dos efeitos promovida pela exposição *in vitro* de floroglucinol e derivados em cérebro de *zebrafish*. As estruturas foram dissecadas e depois transferidas para uma microplaca de 24 poços. O protocolo experimental consistiu de dois períodos de pré-incubação consecutivos, em que os compostos foram adicionados ao meio de reação durante os últimos 15 min. Após a pré-incubação, o meio de reação foi mantido com os compostos para ensaio de MTT ou de captação de glutamato Na<sup>+</sup> dependente. A medida da atividade da LDH extracelular foi realizada recolhendo o meio, após a pré-incubação. Os grupos experimentais de 60 min de toxicidade não aparecem no esquema.

### 3.2.9. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todos os protocolos relatados no presente projeto, que envolvem administração do fármaco, testes comportamentais, eutanásia e preparo de amostras biológicas, foram realizados em salas diferentes da de manutenção dos animais, a fim de reduzir o estresse dos peixes durante a experimentação. Após os experimentos comportamentais, os animais foram anestesiados em solução de triclaína (160 µg/mL) de acordo com Alfaro e colaboradores (2011) e, em seguida, eutanasiados por decapitação, seguindo as recomendações dispostas na literatura, adequadas para a espécie utilizada.

Em artigos de referência sobre tarefas comportamentais padronizadas para *zebrafish*, inclusive naquelas já previamente descritas, o n pode variar de 8 a 16 animais por grupo experimental (MAXIMINO *et al.*, 2011; ROSEMBERG *et al.*, 2011). Com relação aos parâmetros de avaliação de glutamato, o n pode variar de 6 a 12 para realização de dois experimentos independentes (RICO *et al.*, 2010). O teste com PTZ foi realizado de maneira subsequente ao teste de *open tank*, com os mesmos grupos de animais, minimizando o uso dos mesmos.

Todos os procedimentos de manipulação com animais seguiram as normas descritas na Lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei N°11.794 (08.10.2008). Os cuidados com relação à biossegurança seguiram os critérios recomendados por esta Universidade.

#### 3.2.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

---

Para a realização da análise estatística foi utilizado o software GraphPad PRISM5<sup>®</sup>. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão e analisados estatisticamente por Análise da Variância (ANOVA), seguidos de *post hoc* Tukey's. O nível mínimo de significância foi de  $p \leq 0,05$ . As curvas de perfil comportamental foram representadas com mediana e intervalo interquartil.

# 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1. PARTE QUÍMICA

Reações de formação de ligações carbono-carbono (C-C) se tornaram ferramentas muito essenciais na síntese orgânica moderna por suas aplicações na síntese de vários produtos naturais complexos (HEGEDUS, L. S., *Transition Metals in the Synthesis of Complex Organic Molecules*, 1999). Várias metodologias (HASHIGUCHI *et al.*, 2012) para construção de C-C têm sido desenvolvidas, em particular, a formação de C-C por reação direta de uma ligação C-OH com uma ligação C-H seria interessante no processo, uma vez que gera água como subproduto (LI *et al.*, 2013).

A síntese de produtos acilados entre anéis aromáticos e cloretos de acila pode seguir o mecanismo de Friedel-Crafts, uma substituição eletrofílica aromática. O processo de monoacilação do anel ocorre com maior facilidade e após a introdução do primeiro grupamento acila, o anel aromático torna-se menos ativado dificultando a diacilação (OLAH, 1963).

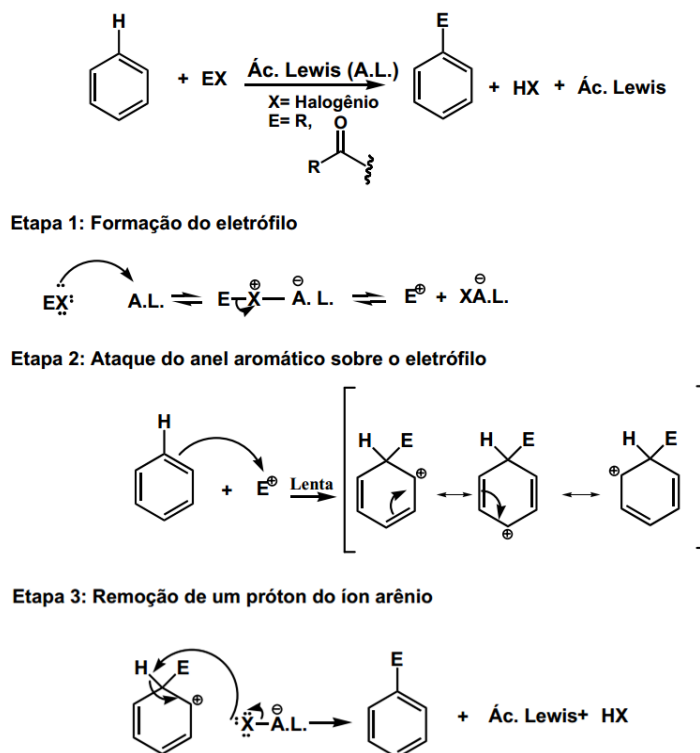


FIGURA 8: Resentação do mecanismo reação de Friedel Crafts. Fonte: Google imagens. Adaptado de Kurti, I., & Czako, b. (2005). *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*.

A partir do floroglucinol e do floroglucinol trimetoxilado foram sintetizados os compostos acilados na presença de um agente acilante e de eterato de BF<sub>3</sub>, sem utilização de solvente (MEIKLE E STEVENS, 1978; DUARTE *et al.*, 2014), através do mecanismo ilustrado acima.

O protocolo para a síntese dos compostos **7** e **8** iniciou com a mistura de ácido isobutírico, agente acilante, e eterato de BF<sub>3</sub>, o catalisador, em balão de reação, sob agitação e atmosfera inerte, seguido da adição do floroglucinol ao meio reacional.

O produto bruto foi purificado através de cromatografia em coluna, iniciando a eluição com 100% de ciclohexano e aumentando gradualmente a polaridade com acetato de etila. As frações recolhidas foram observadas por CCD e, eventualmente, quando o produto ainda apresentava impureza indesejada ao final do processo, era necessário realizar cromatografia em camada delgada em proporção 1:1 com os mesmos solventes. Os produtos finais foram identificados por RMN utilizando como comparação os dados obtidos previamente pelo nosso grupo e na literatura (DUARTE *et al.*, 2014).

O <sup>1</sup>H RMN do composto **7** pode-se observar o sinal em 6,36 ppm (H4 e H6, brs, 2H), atribuído aos hidrogênios do anel benzênico, o multiplete em 4,44 ppm (H12, m, 1H) correspondente ao CH da acila e um duplete (1,61 ppm, *J* = 6,7 Hz) atribuídos às metilas (H9 e H10, d, 6H). Pode-se observar também os hidrogênios das hidroxilas em 9,68 ppm e 12 ppm. Pelo RMN de <sup>13</sup>C também do composto **7**, pode-se constatar a presença do sinal em 209,6 ppm (C7) correspondente ao carbono da carbonila de cetona, o sinal em 38,5 ppm (C8) atribuído ao CH da acila, o sinal indicando a substituição do carbono do anel em 103,5 ppm (C2) e também o sinal em 18,7 ppm (C9, C10) indicando as metilas.

Já no composto **8**, no espectro RMN de <sup>1</sup>H verifica-se o sinal do hidrogênio do anel benzênico em 5,96 ppm (H4, s, 1H), o multiplete em 3,99 ppm representando os hidrogênios do CH-CO (H8 e H12, m, 2H), e o duplete em 1,16 ppm (*J* = 6,8 Hz) correspondente aos hidrogênios das metilas (H9, H10, H13, H14, 12H). O espectro de RMN <sup>13</sup>C do composto **8** apresenta o sinal em 209,8 ppm atribuído às duas carbonilas (C7 e C11) e os sinais em 164,5 ppm (C1) e em 164,2 ppm (C3 e C5), o sinal em 95,0 ppm foi atribuído ao

carbono não substituído do anel (C4) e em 18,6 ppm foi atribuído às metilas (C9, C10, C13, C14).

O composto **9** foi obtido através da mistura de trimetoxibenzeno **6** e óxido de zinco em balão de reação, utilizando diclorometano seco para solubilização. O agente acilante, cloreto de isobutirila, foi cuidadosamente adicionado. O meio reacional passou de branco para esverdeado e depois acinzentado. A reação foi acompanhada por ccd e encerrada 24h depois, com a filtração para a retirada do óxido de zinco. No espectro de RMN <sup>1</sup>H, o duplete ( $J = 7,0$  Hz) em 1,05 ppm foi atribuído aos hidrogênios das metilas da acila (H12, H13, 6H), o multiplete em 2,90 ppm atribuído ao CH da acila (H11, m, 1H), as metilas ligadas às hidroxilas aparecem em 3,77 ppm (H7, H8, brs, 6H) e em 3,83 ppm (H9, s, 3H) e os hidrogênios do anel em 6,26 ppm (H4, H6, s, 2H).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C de **9** apresenta o sinal em 205,8 ppm atribuído à carbonila de cetona (C10), os sinais em 162,1 ppm (C1, C3) e 157,8 ppm (C5) foram atribuídos aos carbonos quaternários do anel, o sinal em 113,2 ppm foi atribuído ao C2. O sinal em 90,6 ppm foi atribuído aos CH do anel (C4, C6), os sinais em 55,2 ppm (C9) e 54,8 ppm (C7, C8) foram atribuídos às metoxilas, e os sinais em 17,1 ppm (C12, C13) foram atribuídos às metilas da acila.

A síntese do composto **10** inicia com a mistura de éterato de BF<sub>3</sub> e ácido acético em balão de reação, sob agitação e atmosfera inerte. À temperatura ambiente, adicionou-se o floroglucinol e se elevou a temperatura até 80°C, deixando reagir por quatro horas, quando foi adicionada solução de acetato de sódio 4% para encerrar a reação. O produto é extraído com acetato de etila (4 x 20 ml) e concentrado em evaporador rotatório. A purificação é feita através de coluna cromatográfica iniciando com 100% de ciclohexano e aumentando a polaridade gradualmente com acetato de etila. Através de CCD, acompanhou-se a eluição do produto da coluna. Eventualmente utilizou-se cromatografia em camada delgada para purificar o produto, eluindo a mesma em mistura de ciclohexano e acetato de etila na proporção 1:1.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H do composto **10** apresenta o sinal em 2,59 ppm atribuído aos hidrogênios da metila (H8, s, 3H) e o sinal em 5,92 ppm atribuído aos hidrogênios do anel (H4, H6, brs, 2H). Já o espectro de RMN <sup>13</sup>C apresenta os sinais em 202,7 ppm atribuído ao carbono da carbonila (C7), os sinais em

164,5 ppm (C3, C1) e 164,4 ppm (C5) foram atribuídos aos carbonos quaternários do anel, o sinal em 104 ppm foi atribuído ao substituinte acila no anel (C2), os sinais em 94,7 ppm (CH) foram atribuídos aos C4 e C6 e o sinal em 31,88 ppm foi atribuído à metila em C8.

Os dados encontrados na análise de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  apresentados acima estão de acordo com publicação prévia do nosso grupo de pesquisa (DUARTE *et al.*, 2013). Outra ferramenta utilizada para a confirmação dos produtos foi a espectrometria de massas, realizada em espectrômetro de alta resolução Q-Tof micro Waters, operando em modo de ionização *electrospray*, na Central Analítica desta Universidade e a massa experimental obtida correspondeu à massa calculada para todos os compostos.

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO FLUOROGLUCINOL E DERIVADOS SINTÉTICOS

---

Desordens do SNC são muito frequentes e associadas a diversas comorbidades, principalmente pelos tratamentos disponíveis falharem em alguns aspectos terapêuticos. Isso se deve a baixa disponibilidade de moléculas neuroativas e seletivas, dessa forma, o desenvolvimento de novos compostos com ação no SNC é de extrema importância (PANGALOS *et al.*, 2007). Um dos principais obstáculos para a descoberta de novos fármacos neuroativos é a dificuldade de encontrar modelos de *screening* disponíveis para o rastreamento de grande número de compostos ativos, considerando que o uso de ratos e camundongos se torna problemático devido ao baixo rendimento em *screenings* e às questões éticas (KOKEL *et al.*, 2008). Recentemente, o *zebrafish* tornou-se um modelo importante para investigação de moléculas bioativas, pois são pequenos, apresentam baixo custo de manutenção, relativa rapidez de desenvolvimento, fácil manuseio e alto rendimento em *screening* farmacológico. Combinado com o sistema de *video tracking*, vários ensaios baseados no comportamento tem sido aplicados com sucesso para identificar novas moléculas potencialmente ativas em *zebrafish* (KOKEL *et al.*, 2010). Além disso, este modelo oferece boa triagem para fármacos antiepilépticos em geral (BERGHMANS *et al.*, 2007), já que é diferente do modelo em roedores onde geralmente as convulsões induzidas por PTZ são utilizadas para identificar agentes anticonvulsivantes que atuam principalmente através do



GABA (LOSCHER, 1984). Todos estes aspectos contribuem para um aumento do número de investigações utilizando o *zebrafish* adulto, que apresenta SNC totalmente desenvolvido quando comparado com larvas de *zebrafish* (CACHAT *et al.*, 2011).

Considerando os dados de literatura que indicam que alguns compostos antidepressivos também apresentam ação anticonvulsivante (SPECCHIO *et al.*, 2004; EPPS *et al.*, 2013), e considerando nossos resultados prévios quanto a potencial atividade antidepressiva de derivados do floroglucinol (STEIN *et al.*, 2012) sintetizados pelo nosso grupo (DUARTE *et al.*, 2013), o produto de partida florogucinol **1** e dois derivados foram avaliados em *zebrafish*, quanto ao comportamento e atividade anticonvulsivante, além de testados *in vitro* para avaliar a neurotoxicidade.

#### 4.2.1. EFEITO DO FLOROGLUCINOL E SEUS DERIVADOS SOBRE A ATIVIDADE LOCOMOTORA E EXPLORATÓRIA

---

Inicialmente, foi realizada a avaliação comportamental dos animais previamente tratados com floroglucinol **1** e os compostos **7** e **8**, administrados via intraperitoneal.

A figura 8 mostra os gráficos referentes aos parâmetros analisados. A distância percorrida pelos animais não sofreu alteração significativa com a administração dos compostos em ambas as doses, comparado com o controle/veículo realizado e com resultados de estudos anteriores que avaliaram este critério (ROSEMBERG *et al.*, 2011).

O tempo que o peixe permanece no topo do aquário vem sendo relacionado, em alguns trabalhos, com sinais de ansiedade/medo: o fato de animais levarem mais tempo para chegar ao topo do aquário e/ou que permanecem nessa área pouco tempo está associado ao aumento da ansiedade (CACHAT *et al.*, 2010; STEWART *et al.*, 2011). Em nossos testes não foi observada alteração significativa, comparados com o controle/veículo, referente ao tempo em que os *zebrafish* se mantêm no topo do aparato experimental.

O tempo que o *zebrafish* permanece imóvel durante o experimento também foi mensurado e não demonstrou diferença estatística entre os compostos testados e o controle do teste.

Sabe-se que comportamentos basais semelhantes são a situação ideal na pesquisa psicofarmacológica, porém este nem sempre é o caso, já que estudos de *endpoints* comportamentais, tais quais utilizados nesse trabalho, são altamente sensíveis a fatores ambientais e de procedimento. No entanto, é importante ressaltar que os animais, tanto controle quanto os tratados, são sempre testados sob as mesmas condições dentro de cada experimento. Dessa forma, manteve-se uma relação total entre os grupos.

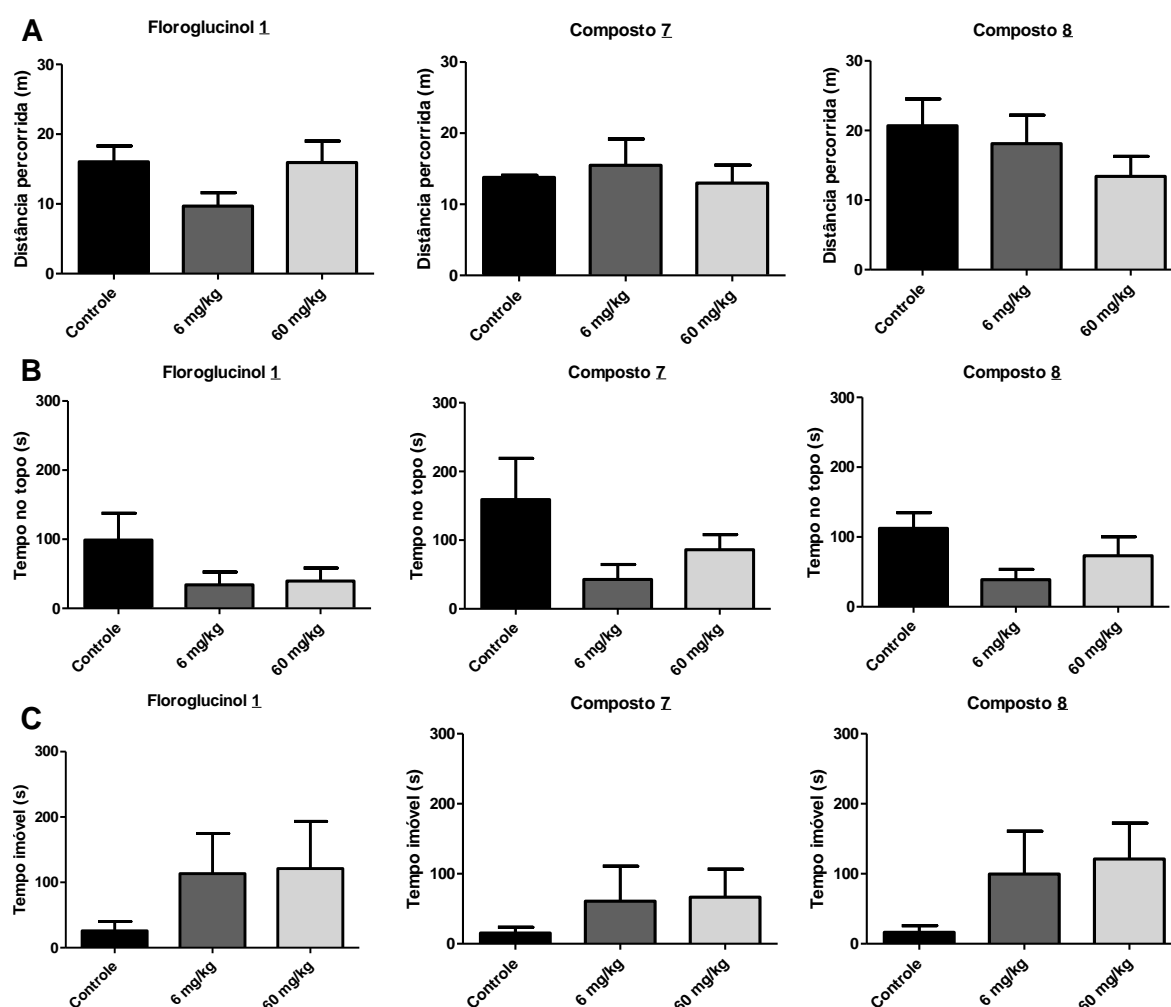


FIGURA 9: Efeito do floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p., sobre a atividade locomotora e exploratória de zebrafish no aparato open tank. (A) Distância percorrida pelo animal (metros), (B) tempo no topo (s) e (C) tempo imóvel (s). Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de Tukey. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

A locomoção ou atividade natatória é um importante parâmetro para verificação comportamental em peixes (BLASER *et al.*, 2010). As avaliações comportamentais feitas em *zebrafish* considerando a preferência do mesmo por determinado espaço do aquário denotam alterações no perfil exibido pelo peixe em resposta ao composto testado. Esta análise pode levar ao conhecimento da atividade biológica de novos compostos (BARROS *et al.*, 2008). Nossos resultados demonstram que a distância total percorrida pelo animal não sofreu alteração significativa, comparada ao controle experimental, para nenhum dos tratamentos. Isto demonstra que o floroglucinol, o composto **7** e o composto **8** não afetaram a atividade locomotora e exploratória dos peixes nas doses testadas. Os dados de velocidade média (m/s) também foram mensurados (dados não mostrados), e corroboraram com os resultados de distância percorrida. Desta forma, podemos inferir que os compostos não causaram sedação ou hiper-locomoção nos animais. Outra variável mensurada no teste do *open tank* é o tempo de permanência dos animais na porção superior do aquário. Em nossos resultados não foi observado alteração neste parâmetro. Para alguns autores, este dado seria equivalente ao tempo de permanência dos roedores no centro do campo aberto (GERLAI *et al.*, 2000; LEVIN *et al.*, 2007; BLASER *et al.*, 2010).

#### 4.2.2. EFEITOS DO FLOROGLUCINOL E SEUS DERIVADOS SOBRE CRISES CONVULSIVAS INDUZIDAS POR PTZ EM ZEBRAFISH: TEMPO DE LATÊNCIA PARA CRISE CONVULSIVA; FREQUÊNCIA ACUMULADA DA CONVULSÃO; PERFIL CONVULSIVO E INTENSIDADE DA CONVULSÃO.

---

Os *zebrafish* foram imersos em solução de PTZ 10 mM e monitorizados durante 20 minutos através de *videotracking* para avaliar as crises convulsivas. Para caracterizar cada fase, as manifestações comportamentais foram avaliadas de acordo com a literatura (WONG *et al.*, 2010; STEWART *et al.*, 2012) sendo descrita considerando os escores estipulados para *zebrafish*: (0) nado curto, (1) aumento da velocidade de natação e alta frequência do movimento dos opérculos, (2) movimentos irregulares e erráticos, (3) movimentos circulares, (4) convulsões tipo clônicas, (5) queda para o fundo do aquário, perda de postura e convulsões tipo tônicas, (6) morte (MUSSULINI *et*

al., 2013). É importante salientar que as alterações aleatórias em *zebrafish* induzidas por PTZ (por exemplo, saltar) não foram consideradas.

Para verificar os efeitos dos compostos estudados na proteção da convulsão aguda induzida por PTZ em *zebrafish*, o tempo para o início (latência) da crise convulsiva e o tempo necessário para o peixe retomar o seu nado normal após a exposição de 20 minutos no aquário contendo o indutor da convulsão, PTZ 10 mM, foram mensurados.

Na figura 9, percebe-se que os tratamentos com floroglucinol **1** e com o composto **8** não alteram significativamente o tempo para a primeira crise convulsiva. Já o composto **7** apresentou uma alteração significativa na dose de 60 mg/kg, aumentando o tempo para o início da crise convulsiva ( $p < 0,001$ ).

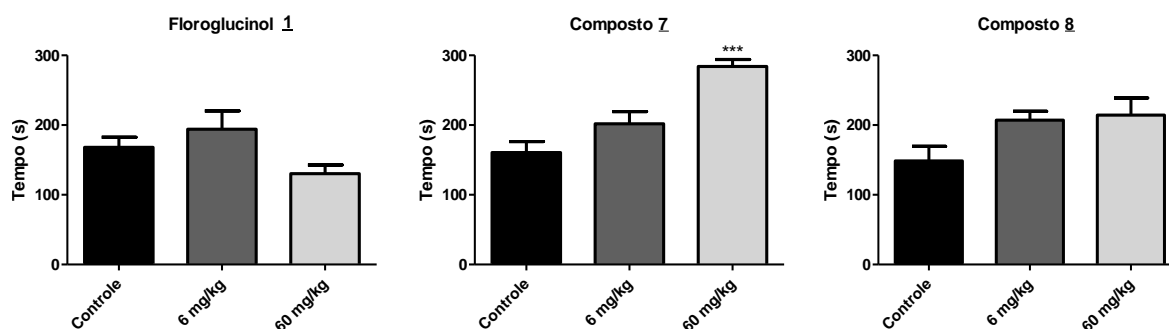


FIGURA 10: Efeito do floroglucinol **1** (n=9) e seus derivados, composto **7** (n=9) e composto **8** (n=9), administrados via i.p., sobre o tempo (s) necessário para o *zebrafish* atingir a primeira crise convulsiva induzida por PTZ (10mM). Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. \*\*\* $p < 0,001$ . Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de *Tukey*. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão

A busca de novos anticonvulsivantes requer modelos adequados para realizar o rastreamento de um grande número de compostos potencialmente ativos. Devido ao baixo custo e à possibilidade de testar um grande número de animais rapidamente, o *zebrafish* surge como um modelo convulsivo complementar, promissor para a descoberta de novos compostos nesse campo (BERGHMANS *et al.*, 2007).

Estes resultados mostram potencial atividade protetora da convulsão para o composto **7**, o qual aumentou o tempo necessário para os animais atingirem a primeira crise convulsiva. Além disso, considerando os dados referentes ao comportamento exploratório e locomoção, podemos sugerir que

sua ação está envolvida com o SNC, e não com o sistema periférico, visto que os animais mantiveram as características normais, sem comprometimento da função motora no aparato *open tank*, exibidos aqui quanto ao comportamento exploratório e locomoção.

Os animais imersos em solução de PTZ 10 mM tiveram seu perfil convulsivo classificado em diferentes escores. A figura 11 representa os escores que cada animal apresentou ao longo do tempo. Percebe-se que houve uma progressão rápida dos escores nos primeiros 5 minutos (300 s), em vista disso, a fim de realizar uma análise ao longo do tempo, os primeiros 5 min foram divididos em intervalos de 30 segundos e os restantes 15 min em intervalos de 150 s, conforme já preconizado no trabalho de Mussulini e colaboradores (2013). Observa-se que, nos animais que receberam somente o veículo, o tempo necessário para que a maioria dos animais atinja o escore 4 e 5 é em torno de 120 s e 180 s respectivamente. Os animais tratados com floroglucinol **1** atingiram o escores 4 e 5 mais rapidamente, em todas as doses testadas.

Os animais tratados com o composto **7** mostraram um adiamento para atingir o escore 4. Observa-se que a maioria dos animais atingiu este escore, na dose de 6 mg/kg, em 240 s e em 600 s todos os animais já exibiram o escore 5. Na dose de 60 mg/kg, a maioria dos animais atinge o escore 4 depois de transcorridos 300 s e em 450 s. Metade dos animais atinge o escore 5 em 600 s e permanece assim até o término da análise. Estes achados corroboram para potencial ação anticonvulsivante do composto **7**. Os animais tratados com o composto **8**, embora não tendo demonstrado aumento significativo na latência para atingir a primeira convulsão e mostra efeito discreto na proteção da crise, pelas curvas de perfil convulsivo.

A fim de avaliar a intensidade da convulsão ao longo do tempo, a área sobre a curva (AUC) de perfil convulsivo foi medida para cada animal. O tempo total (20 min) foi dividido em três períodos: 0-150 s, 150-300 s e 300-1200 s. Para o floroglucinol **1**, percebe-se a grande elevação da AUC já no primeiro período, já que a crise convulsiva se inicia mais rapidamente. O composto **7** mostrou diferença significativa em relação ao veículo em ambas as doses, diminuindo a intensidade da convulsão nos dois primeiros períodos. Já o composto **8** mostrou diminuir a intensidade da convulsão na dose mais alta.

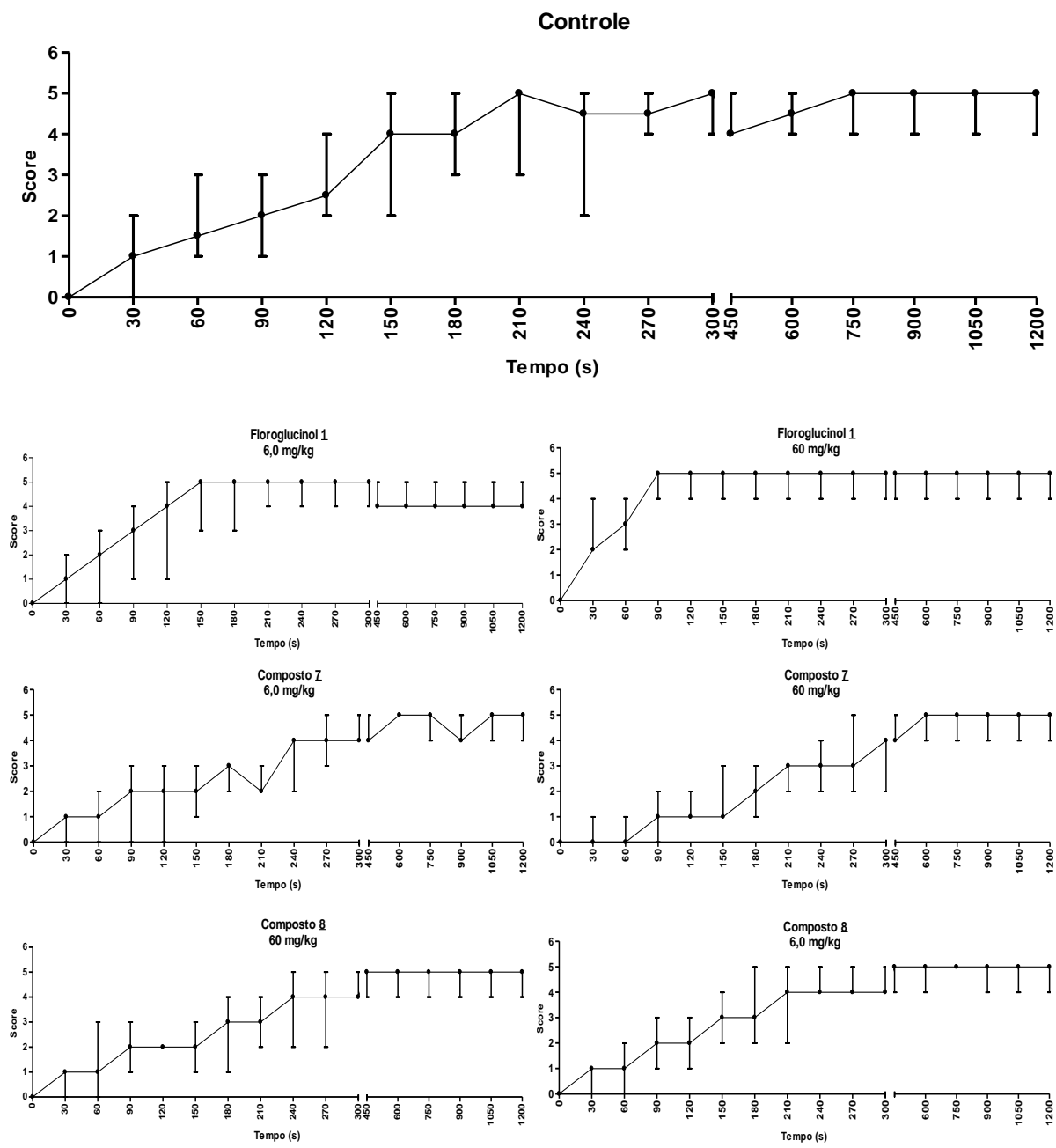


FIGURA 11: Perfil comportamental de convulsões induzidas por ptz 10 mm em *zebrafish* adultos tratados com floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p.. Escores da crise convulsiva (apenas a maior pontuação alcançada foi considerada em cada intervalo). Controle polissorbato 80 5% em água milliQ. Os dados estão representados como mediana ± intervalo interquartil.

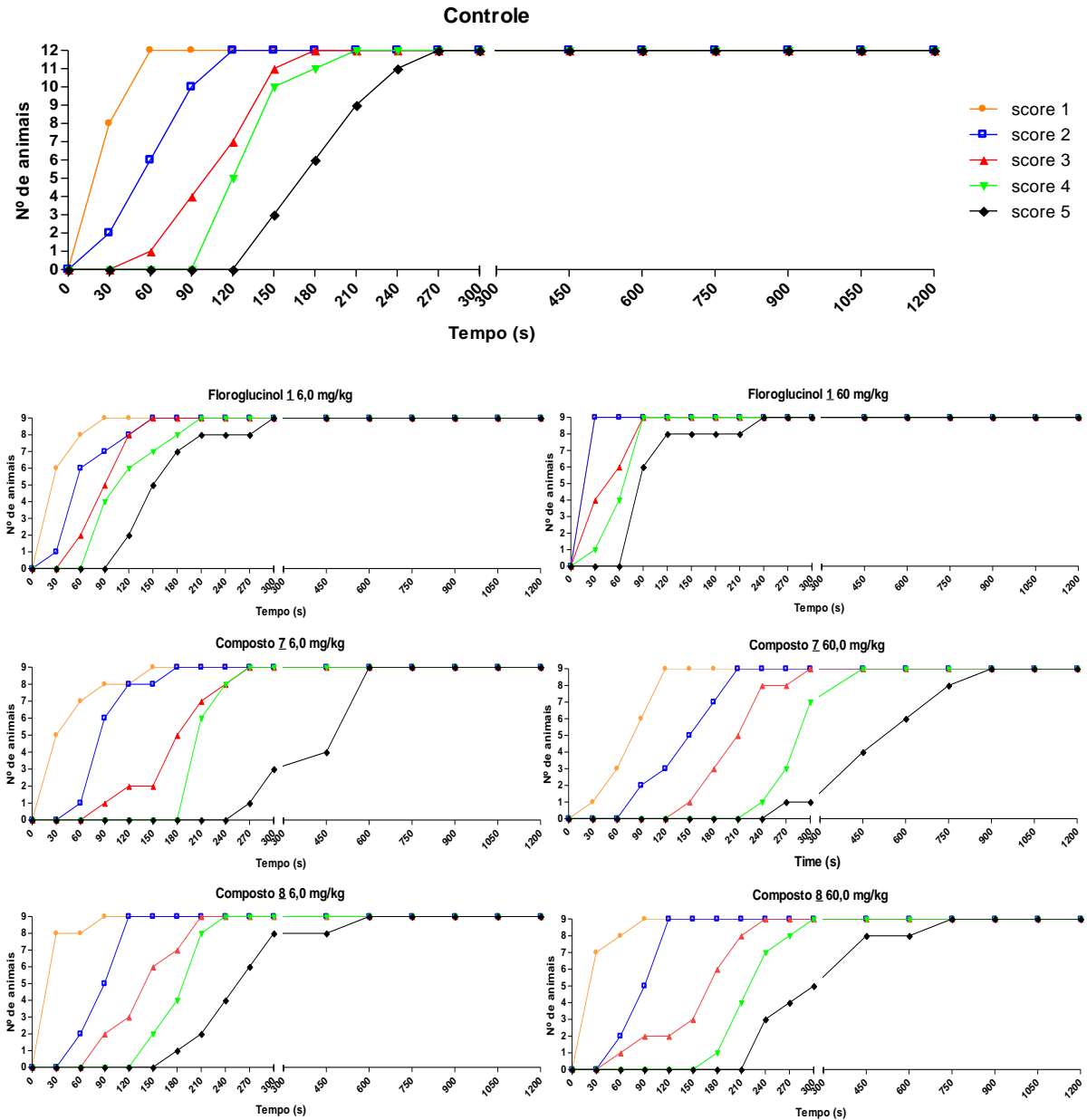


FIGURA 12: Perfil comportamental de convulsões induzidas por ptz 10 mm em *zebrafish* adulto tratados com floroglucinol 1 (n=9) e seus derivados, composto 7 (n=9) e composto 8 (n=9), administrados via i.p. Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. Os gráficos apresentam a freqüência cumulativa e os dados estão representados como o número de animais que atingiu o escore ao longo do tempo.

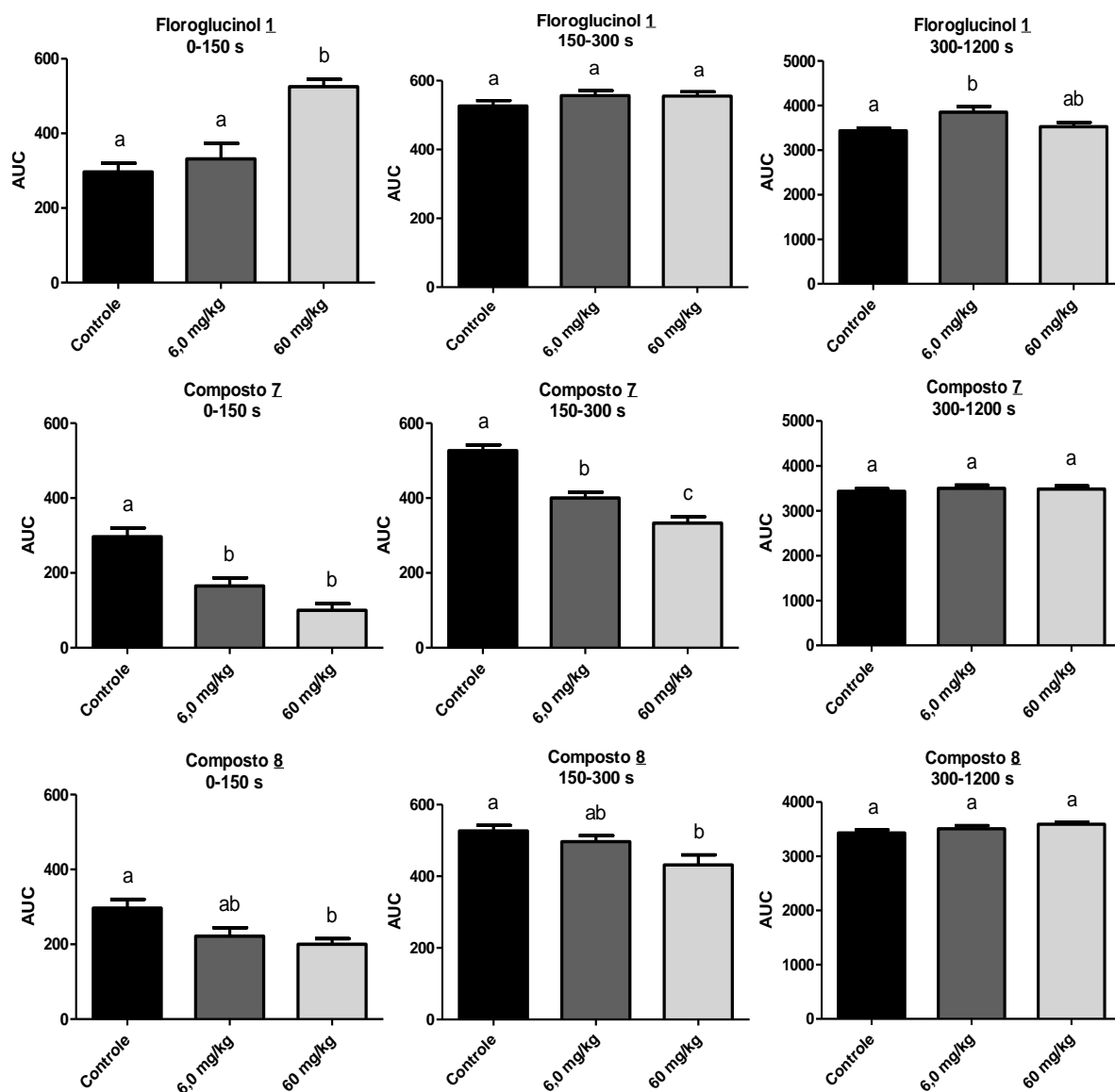


FIGURA 13: Intensidade da convulsão em *zebrafish* adultos tratados com floroglucinol **1** (n=9) e seus derivados, composto **7** (n=9) e composto **8** (n=9), administrados via i.p., durante os testes em períodos distintos (0-150, 150-300, e 300-1200 s) avaliados pela área sob a curva observada para cada tratamento. Controle: polissorbato 80 5% em água milliQ. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de *Tukey*.

A figura 13 ilustra os dados referentes ao tempo necessário para o escore 0, ou seja, o nado normal. Na dose de 60 mg/kg, o floroglucinol **1** mostrou aumento do tempo necessário para os animais retornassem ao nado normal ( $p < 0,05$ ). O composto **8** não mostrou alteração significativa em nenhuma dose e o composto **7**, em 60 mg/kg, reduziu significativamente a latência ( $p < 0,01$ ), mostrando que os animais tendem a se recuperar e



atingem mais rapidamente as características de nado normal após a crise convulsiva.

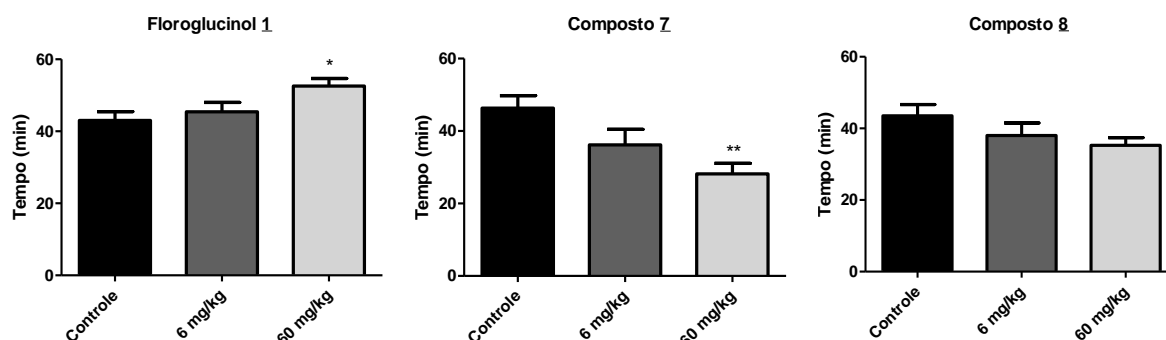


FIGURA 14: Latência (min) para o retorno ao nado normal após a indução convulsiva por PTZ em *zebrafish* tratados com floroglucinol **1** (n=9), composto **7** (n=9) e composto **8** (n=9) via i.p. \*p<0,05, \*\*p<0,01. Teste estatístico: ANOVA de uma via seguida de teste comparativo de *Tukey*. Os resultados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.2.3. EFEITOS DO FLOROGLUCINOL E SEUS DERIVADOS SOBRE A CAPTAÇÃO DE GLUTAMATO E AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ATRAVÉS DE MTT E LDH EM CÉREBRO DE *ZEBRAFISH*.

A figura 15 mostra os dados de captação de glutamato Na<sup>+</sup> dependente. Podemos observa que o floroglucinol **1** diminuiu significativamente a captação em todas as concentrações testadas. O composto **7** apresentou aumento significativo da captação de glutamato na menor concentração, e um efeito paradoxial, diminuindo a captação com o aumento da concentração. Já o composto **8** apresentou diminuição da captação em todas as concentrações testadas.

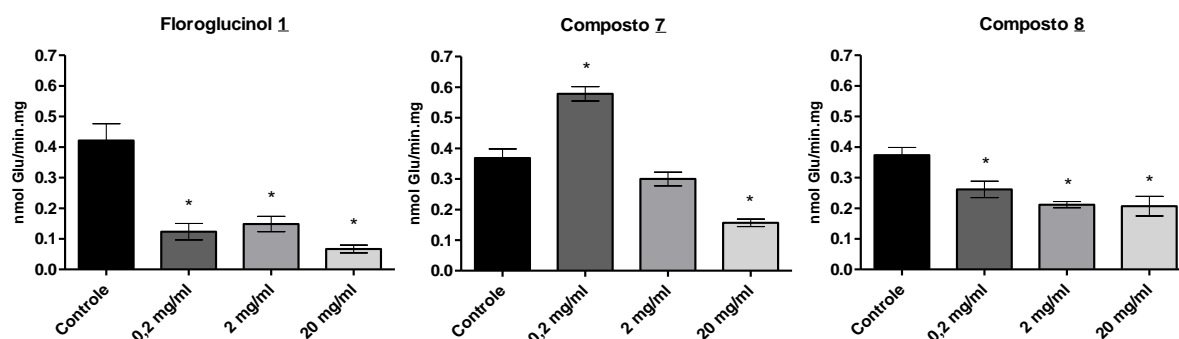


Figura 15: Efeito do floroglucinol **1**, composto **7** e composto **8** sobre a captação de glutamato Na<sup>+</sup> dependente. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) utilizando n = 6 por grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de

Bonferroni, considerando as diferenças estatísticas de  $p \leq 0,05$ . \*Diferença significativa do grupo controle.

Os modelos animais de epilepsia e de crise convulsivas agudas têm sido úteis para desvendar os papéis de vários neurotransmissores na epileptogênese. A epilepsia e as convulsões são geralmente consideradas como resultado de um desequilíbrio entre os sistemas excitatório (glutamatérgico) e o sistema inibitório (GABAérgico) (BRADFORD, 1995; SCHARFMAN, 2007; MARMIROLI E CVALETTI, 2012). Além disso, sabe-se que um episódio de crise convulsiva aumenta a probabilidade de ocorrerem crises futuras (HAUSER E LEE, 2002; BEN-ARI *et al.*, 2008), aumentando a propensão a cada episódio de crise (MORIMOTO *et al.*, 2004; JEFFERYS, 2010). Estas crises epilépticas podem resultar na morte excitotóxica de neurônios em várias regiões do cérebro (COSTA *et al.*, 2004; ANDRÉ *et al.*, 2007), acredita-se que com a morte neuronal há um aumento considerável de fibras na tentativa de reconectar as terminações nervosas que sofreram destruição (SHARMA *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2012). Como resultado há um grande aumento nas sinapses, algumas de natureza glutamatérgica, exacerbando excessivamente o equilíbrio excitatório do sistema. A morte celular excitotóxica e o crescimento anormal dos circuitos de excitação não ocorrem apenas em animais, mas também em humanos com epilepsia (DE LANEROLLE *et al.*, 1989; GOLDBERG E COULTER, 2013). Além disso, este desequilíbrio está relacionado com disfunções astrócitárias; os astrócitos desempenham um papel fundamental no SNC regulando a captação de glutamato para manter o cérebro funcionando corretamente (HERTZ E ZIELKE, 2004; COULTER E EID, 2012), mantendo o tônus glutamatérgico. Quando os astrócitos tornam-se disfuncionais, o desequilíbrio que ocorre neste sistema exacerba as funções excitatórias tornando-se prejudicial. Foi demonstrado que a hipertrofia astrocítica em ratos começa a ocorrer assim que se iniciam as crises epilépticas (SHAPIRO *et al.*, 2008). Além disso, a enzima de degradação do glutamato, glutamina sintetase, tem se mostrado disfuncional nos astrócitos do hipocampo humano (DE LANEROLLE *et al.*, 1989; PETROFF *et al.*, 2002; EID *et al.*, 2008) e em ratos com epilepsia experimental (ESTRADA *et al.*, PEREZ *et al.*, 2012). Enzimas astrocitárias disfuncionais certamente

poderiam ser o contribuinte primário para o excesso de glutamato no cérebro gerando excitotoxicidade (SCHOUSBOE E WAAGEPETERSEN, 2005; DE LANEROLLE *et al.*, 2010). Assim, parece que os astrócitos e seu conteúdo enzimático tem grande relação com o processo epiléptico no cérebro de humanos e modelo animal.

A rápida retirada de glutamato da sinapse por seus transportadores é necessária para a neurotransmissão excitatória normal e prevenção contra toxicidade induzida por glutamato. Sabe-se que a receptação deficitária de glutamato na fenda sináptica acarreta em níveis elevados deste neurotransmissor, capaz de gerar doenças neurodegenerativas (SHELDON E ROBINSON, 2007; KALININE *et al.*, 2014). A fim de verificar a possível toxicidade causada pela presença excessiva de glutamato na fenda sináptica, os testes de LDH e MTT em cérebro de *zebrafish* foram realizados em 15 min, mesmo tempo de incubação utilizado para analisar a captação de glutamato, e 60 min, para avaliarmos esses efeitos em longo prazo. Podemos observar que o floroglucinol **1** demonstrou ser tóxico em ambos os métodos, aumentando a atividade da LDH dependente da concentração. Considerando que, para esta molécula, houve redução da captação de glutamato já em 0,2 mg/ml, e a morte celular é detectada a partir da mesma concentração a partir da concentração de 2 mg/ml e morte celular detectada na mesma concentração, não podemos inferir se o dano celular é proveniente de um evento excitotóxico causado pela presença excessiva de glutamato. Os resultados do MTT podem indicar que o floroglucinol tem uma ação tóxica sobre as células mesmo em baixas doses, e a menor viabilidade celular leva a menores níveis de captação de glutamato. O composto **7** não demonstrou toxicidade em cérebro de *zebrafish* nestes testes, apenas verificou-se um aumento da atividade da enzima LDH na maior concentração testada e após 60 min. A partir disso, podemos sugerir que o composto **7**, por aumentar a captação de glutamato já na concentração de 0,2 mg/ml, impede que o excesso deste neurotransmissor cause dano nas células neuronais nessa concentração. Entretanto, na maior concentração, a captação parece diminuir decorrente de algum dano causado pela alta concentração deste composto, como observado pela atividade da LDH, uma vez que não observamos alterações significativas no ensaio de MTT. O composto **8**, em 15 min, mostrou toxicidade no teste de MTT a partir da concentração de 2mg/ml e

em todas as concentrações no tempo de 60 min. No LDH, apenas a concentração de 2 mg/ml em 60 min causou alteração significativa. A diminuição da captação de glutamato na fenda, que acontece já em 0,2 mg/ml não interferiu na morte celular nessa concentração; dessa forma, o dano precede a diminuição da captação de glutamato, para estes métodos, a partir de 2,0 mg/ml.

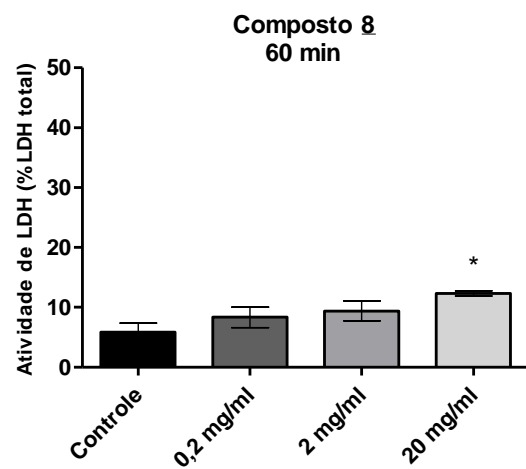
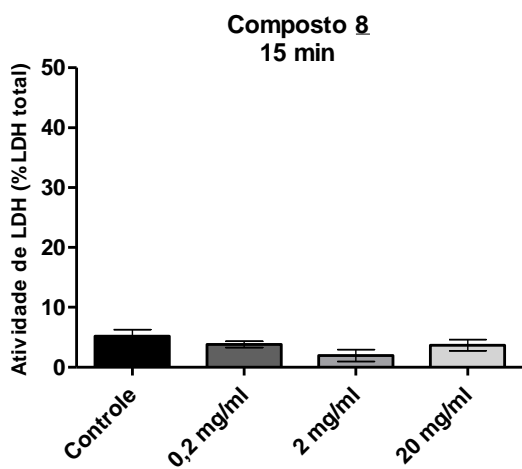
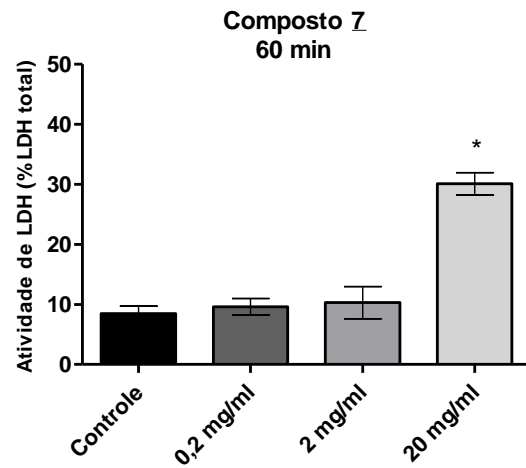
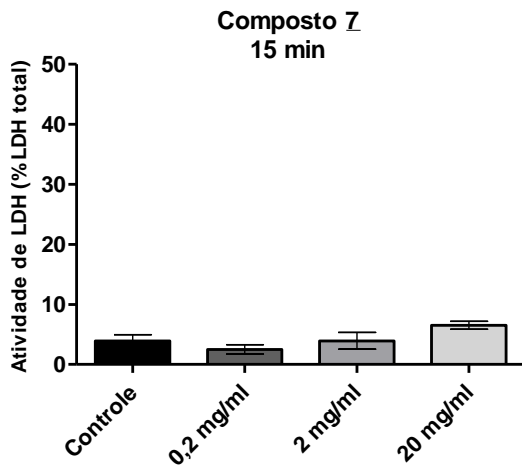
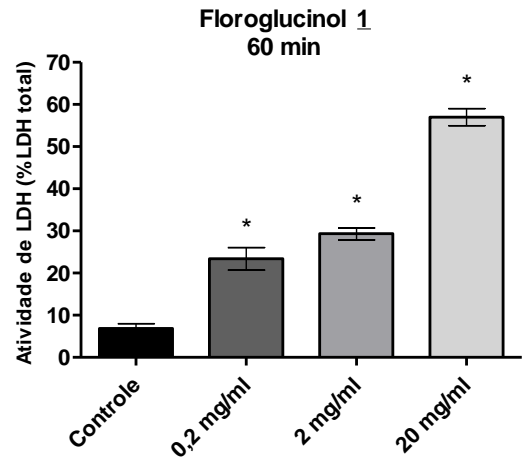
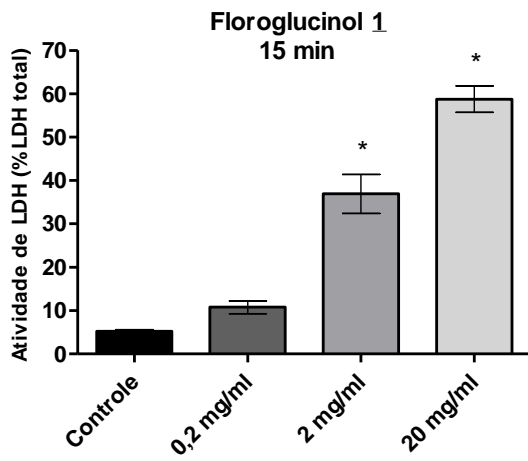


FIGURA 16: Efeito do floroglucinol 1, composto 7 e composto 8 sobre a atividade da enzima LDH. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) utilizando n = 6 por grupo. Os resultados foram

analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, considerando as diferenças estatísticas de  $p \leq 0,05$ . \*Diferença significativa do grupo controle.

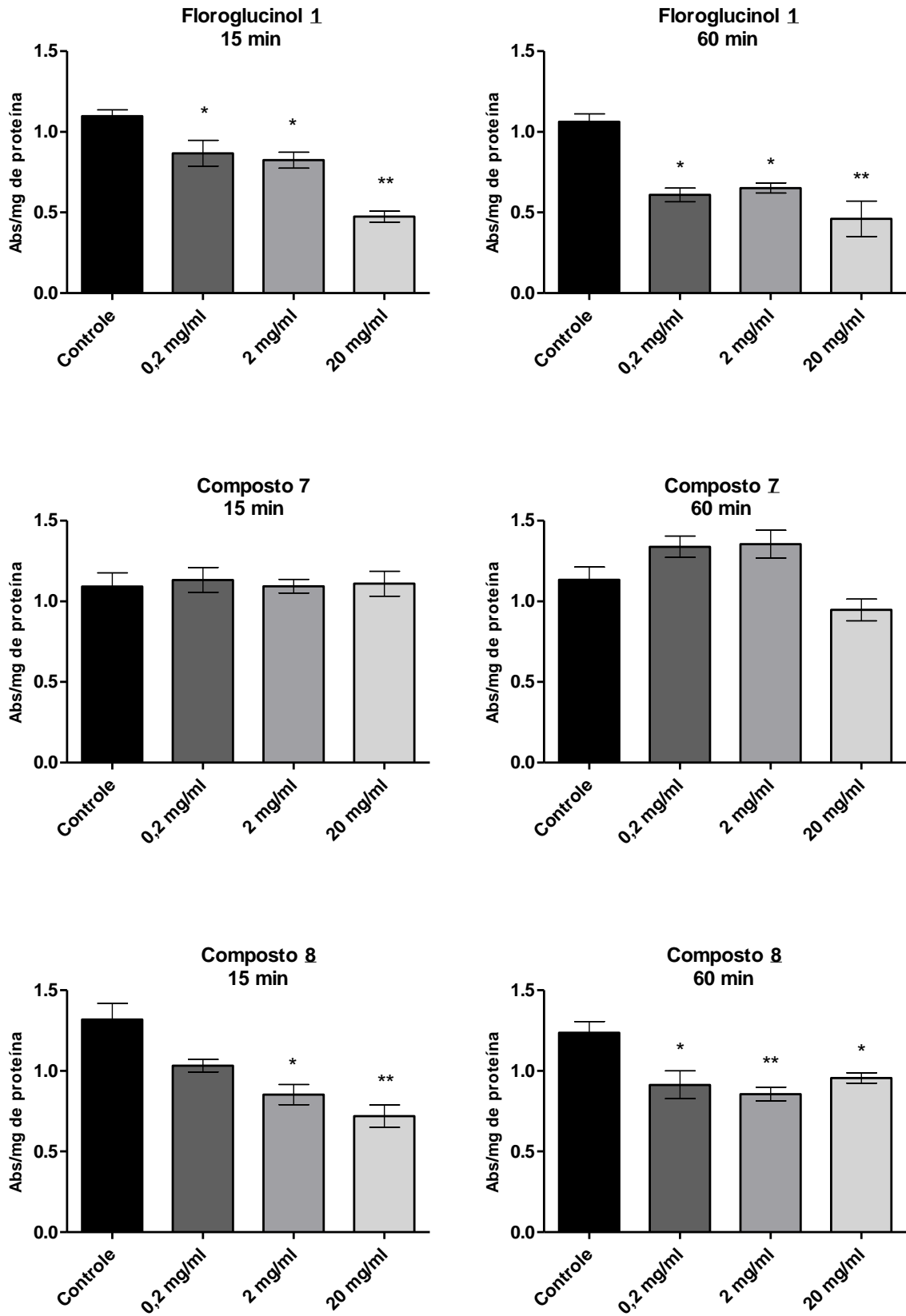


FIGURA 17: Efeito do floroglucinol 1, composto 7 e composto 8 sobre a viabilidade celular mensurada pela redução do MTT. Os dados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão da média (SEM) utilizando n = 6 por

grupo. Os resultados foram analisados por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni, considerando as diferenças estatísticas de  $p \leq 0,05$ .  
\*diferença significativa do grupo controle.



## 5. CONCLUSÕES

---

A síntese de compostos eficazes contra as crises convulsivas torna-se importante para a busca de medicamentos capazes de minimizar essa manifestação.

Os derivados do floroglucinol **1** e floroglucinoltrimetoxilado **6**, compostos **7**, **8**, **9** e **10**, foram sintetizados através do mecanismo de Friedel Crafts com rendimentos entre 25% e 80%.

O floroglucinol **1** e os compostos **7** e **8** foram administrados em *zebrafish* para avaliação comportamental e anticonvulsivante. Verificou-se que nenhum dos compostos alterou a atividade exploratória dos animais no *open tank*, demonstrando que estes compostos não causam prejuízo na locomoção.

Quando submetidos à indução da convulsão por PTZ, os animais administrados com o floroglucinol **1** mostraram adiantamento da primeira crise convulsiva, diferente do composto **7** que aumentou significativamente o tempo para o início da crise.

Além da avaliação do tempo para o início da crise, investigaram-se os efeitos dos compostos através das curvas de perfil convulsivo, frequência acumulada e intensidade da convulsão. Estes dados mostraram potencial atividade neuroprotetora para o composto **7**.

Na busca pelo mecanismo de ação destes compostos, os testes *in vitro* com o cérebro total de *zebrafish* demonstraram que o composto **7** elevou significativamente a captação de glutamato nos animais, mostrando que este neurotransmissor está envolvido na proteção frente à crise convulsiva deste composto. Além disso, os testes de MTT e LDH mostram ausência de neurotoxicidade.

Desta forma, nossos resultados contribuem para a busca de compostos potencialmente ativos frente a crises convulsivas induzidas por PTZ.



## 6. REFERÊNCIAS

---

- Abreu, I. N., Porto, A. L., Marsaioli, A. J., & Mazzafera, P. (2004). Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, *167*(4), 949-954.
- Alfaro, J.M., Ripoll-Gomez, J., Burgos, J.S., 2011. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. *Eur J Neurosci* *33*, 1252-1255.
- Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, *32*(1), 1-14.
- André, V., Dubé, C., François, J., Leroy, C., Rigoulot, M. A., Roch, C., ... & Nehlig, A. (2007). Pathogenesis and Pharmacology of Epilepsy in the Lithium-pilocarpine Model. *Epilepsia*, *48*(s5), 41-47.
- Avoli, M., Louvel, J., Pumain, R., & Köhling, R. (2005). Cellular and molecular mechanisms of epilepsy in the human brain. *Progress in neurobiology*, *77*(3), 166-200.
- Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P., & Jakus, R. (2007). Serotonin and epilepsy. *Journal of neurochemistry*, *100*(4), 857-873.
- Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier, H. (2005). Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience*, *131*(3), 759-768.
- Barros, T. P., Alderton, W. K., Reynolds, H. M., Roach, A. G., & Berghmans, S. (2008). Zebrafish: an emerging technology for in vivo pharmacological assessment to identify potential safety liabilities in early drug discovery. *British journal of pharmacology*, *154*(7), 1400-1413.
- Baxendale, S., Holdsworth, C. J., Santoscoy, P. L. M., Harrison, M. R., Fox, J., Parkin, C. A., ... & Cunliffe, V. T. (2012). Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Disease models & mechanisms*, *5*(6), 773-784.
- Beerhues, Ludger. "Hyperforin." *Phytochemistry* *67.20* (2006): 2201-2207.
- Ben-Ari, Y., Crepel, V., & Represa, A. (2008). Seizures beget seizures in temporal lobe epilepsies: the boomerang effects of newly formed aberrant kainatergic synapses. *Epilepsy Currents*, *8*(3), 68-72.
- Bennett, M. R., & Balcar, V. J. (1999). Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochemistry international*, *35*(4), 269-280.
- Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P. (2007). Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy research*, *75*(1), 18-28.

- Birt, D. F., Widrechner, M. P., Hammer, K. D., Hillwig, M. L., Wei, J., Kraus, G. A., ... & Price, J. P. (2009). Hypericum in infection: Identification of anti-viral and anti-inflammatory constituents. *Pharmaceutical biology*, 47(8), 774-782.
- Blaser, R. E., Chadwick, L., & McGinnis, G. C. (2010). Behavioral measures of anxiety in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural brain research*, 208(1), 56-62.
- Bradford, H. F. (1995). Glutamate, GABA and epilepsy. *Progress in neurobiology*, 47(6), 477-511.
- Brodie, M. J. (2010). Antiepileptic drug therapy the story so far. *Seizure*, 19(10), 650-655.
- Brodie, M. J., Covanis, A., Gil-Nagel, A., Lerche, H., Perucca, E., Sills, G. J., & White, H. S. (2011). Antiepileptic drug therapy: does mechanism of action matter?. *Epilepsy & Behavior*, 21(4), 331-341.
- Cachat, J., Stewart, A., Utterback, E., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., ... & Kalueff, A. V. (2011). Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior. *PloS one*, 6(3), e17597.
- Cardamone, L. (2012). Antidepressant pharmacotherapy in epilepsy: the effects of chronic fluoxetine and citalopram treatments in a rat model of epileptogenesis.
- Carpenter, D. J. (2011). St. John's wort and S-adenosyl methionine as "natural" alternatives to conventional antidepressants in the era of the suicidality boxed warning: what is the evidence for clinically relevant benefit?. *Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic*, 16(1), 17-39.
- Ccana-Ccapatinta, G. V., de Barros, F. M. C., Bridi, H., & von Poser, G. L. (2014). Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from sections *Brathys* and *Trigynobrathys*. *Phytochemistry Reviews*, 1-26.
- Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S. K., Wonnemann, M., Singer, A., & Müller, W. E. (1998). Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life sciences*, 63(6), 499-510.
- Cho, C. H. (2013). New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7.
- Collingridge, G. L., Isaac, J. T., & Wang, Y. T. (2004). Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(12), 952-962.
- Coulter, D. A., & Eid, T. (2012). Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia*, 60(8), 1215-1226.
- Crispin, M. C., & Wurtele, E. S. (2013). Use of metabolomics and transcriptomics to gain insights into the regulation and biosynthesis of medicinal compounds: *Hypericum* as a model. In *Biotechnology for Medicinal Plants* (pp. 395-411). Springer Berlin Heidelberg.

- Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), 1-105.
- De Lanerolle, N. C., Kim, J. H., Robbins, R. J., & Spencer, D. D. (1989). Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain research*, 495(2), 387-395.
- de Lanerolle, N. C., Lee, T. S., & Spencer, D. D. (2010). Astrocytes and epilepsy. *Neurotherapeutics*, 7(4), 424-438.
- Deckers, C. L., Knoester, P. D., De Haan, G. J., Keyser, A., Renier, W. O., & Hekster, Y. A. (2003). Selection criteria for the clinical use of the newer antiepileptic drugs. *CNS drugs*, 17(6), 405-421.
- do Rego, J. C., Benkiki, N., Chosson, E., Kabouche, Z., Seguin, E., & Costentin, J. (2007). Antidepressant-like effect of hyperfoliatin, a polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae) is associated with an inhibition of neuronal monoamines uptake. *European journal of pharmacology*, 569(3), 197-203.
- Duarte, M. O., Lunardelli, S., Kiekow, C. J., Stein, A. C., Müller, L., Stolz, E., ... & Gosmann, G. (2014). Phloroglucinol derivatives present an antidepressant-like effect in the mice tail suspension test (TST). *Natural product communications*, 9(5), 671-674.
- Eid, T., Williamson, A., Lee, T. S. W., Petroff, O. A., & De Lanerolle, N. C. (2008). Glutamate and astrocytes—key players in human mesial temporal lobe epilepsy?. *Epilepsia*, 49(s2), 42-52.
- Engel, J. (2006). ILAE classification of epilepsy syndromes. *Epilepsy research*, 70, 5-10.
- Epps, S. A., Kahn, A. B., Holmes, P. V., Boss-Williams, K. A., Weiss, J. M., & Weinshenker, D. (2013). Antidepressant and anticonvulsant effects of exercise in a rat model of epilepsy and depression comorbidity. *Epilepsy & Behavior*, 29(1), 47-52.
- Ernst, E. (Ed.). (2003). *Hypericum: the genus Hypericum*. CRC Press.
- Estrada, F. S., Hernández, V. S., López-Hernández, E., Corona-Morales, A. A., Solís, H., Escobar, A., & Zhang, L. (2012). Glial activation in a pilocarpine rat model for epileptogenesis: a morphometric and quantitative analysis. *Neuroscience letters*, 514(1), 51-56.
- Fattore, C., & Perucca, E. (2011). Novel medications for epilepsy. *Drugs*, 71(16), 2151-2178.
- Favale, E., Rubino, V., Mainardi, P., Lunardi, G., & Albano, C. (1995). Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans. *Neurology*, 45(10), 1926-1927.
- Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the

International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.

Fontella, F. U., Cimarosti, H., Crema, L. M., Thomazi, A. P., Leite, M. C., Salbego, C., ... & Netto, C. A. (2005). Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain research bulletin*, 65(5), 443-450.

Fontella, F.U., Cimarosti, H., Crema, L.M., Thomazi, A.P., Leite, M.C., Salbego, C., Goncalves, C.A., Wofchuk, S., Dalmaz, C., Netto, C.A., 2005. Acute and repeated restraint stress influences cellular damage in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation. *Brain Res. Bull.* 65, 443–450.

Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S., & Rosenthal, A. (2000). Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology biochemistry and behavior*, 67(4), 773-782.

Gidal, B. E. (2013). Serotonin and Epilepsy: The Story Continues. *Epilepsy Currents*, 13(6), 289-290.

Glombitza, K. W., Rösener, H. U., Vilter, H., & Rauwald, W. (1973). Antibiotics from Algae. 8. Phloroglucinol from Phaeophyceae (author's transl). *Planta medica*, 24(4), 301.

Goldberg, E. M., & Coulter, D. A. (2013). Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(5), 337-349.

Hashiguchi, B. G., Bischof, S. M., Konnick, M. M., & Periana, R. A. (2012). Designing catalysts for functionalization of unactivated C–H bonds based on the CH activation reaction. *Accounts of chemical research*, 45(6), 885-898.

Hauser, W. A., & Lee, J. R. (2002). Do seizures beget seizures?. *Progress in brain research*, 135, 215-219.

Hegedus, L. S. (1999). *Transition metals in the synthesis of complex organic molecules*. University Science Books.

Hertz, L., & Zielke, H. R. (2004). Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends in neurosciences*, 27(12), 735-743.

Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S. C. (2010). Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. *Disease models & mechanisms*, 3(3-4), 144-148.

Jefferys, J. G. (2010). Advances in understanding basic mechanisms of epilepsy and seizures. *Seizure*, 19(10), 638-646.

Jobe, P. C., & Browning, R. A. (2005). The serotonergic and noradrenergic effects of antidepressant drugs are anticonvulsant, not proconvulsant. *Epilepsy & Behavior*, 7(4), 602-619.

- Kalinine, E., Zimmer, E. R., Zenki, K. C., Kalinine, I., Kazlauckas, V., Haas, C. B., ... & Portela, L. V. (2014). Nandrolone-induced aggressive behavior is associated with alterations in extracellular glutamate homeostasis in mice. *Hormones and behavior*, 66(2), 383-392.
- Kanner, A. M. (2009). Psychiatric issues in epilepsy: the complex relation of mood, anxiety disorders, and epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 15(1), 83-87.
- Kinkel, M. D., Eames, S. C., Philipson, L. H., & Prince, V. E. (2010). Intraperitoneal injection into adult zebrafish. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (42).
- Koh, J. Y., & Choi, D. W. (1987). Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *Journal of neuroscience methods*, 20(1), 83-90.
- Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C. Y. J., Mateus, R., ... & Peterson, R. T. (2010). Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nature chemical biology*, 6(3), 231-237.
- Korff, C. M., & Scheffer, I. E. (2013). Epilepsy classification: a cycle of evolution and revolution. *Current opinion in neurology*, 26(2), 163-167.
- Kraus, G. A., & Liu, F. (2012). Synthesis of uliginosins A and B. *Natural product communications*, 7(2), 191-192.
- Kuhnke, J., & Bohlmann, F. (1985). Synthesis of naturally occurring phloroglucinol derivatives. *Tetrahedron letters*, 26(33), 3955-3958.
- Kurti, L., & Czakó, B. (2005). Strategic applications of named reactions in organic synthesis. Elsevier.
- Kuo, L. W., Lee, C. Y., Chen, J. H., Wedeen, V. J., Chen, C. C., Liou, H. H., & Tseng, W. Y. I. (2008). Mossy fiber sprouting in pilocarpine-induced status epilepticus rat hippocampus: a correlative study of diffusion spectrum imaging and histology. *Neuroimage*, 41(3), 789-800.
- Kwan, P., & Brodie, M. J. (2001). Effectiveness of first antiepileptic drug. *Epilepsia*, 42(10), 1255-1260.
- Lai, T. W., Zhang, S., & Wang, Y. T. (2014). Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology*, 115, 157-188.
- Levin, E. D., Bencan, Z., & Cerutti, D. T. (2007). Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & behavior*, 90(1), 54-58.
- Li, W., Zhang, Z., Kong, B., Feng, S., Wang, J., Wang, L., ... & Zhao, D. (2013). Simple and Green Synthesis of Nitrogen-Doped Photoluminescent Carbonaceous Nanospheres for Bioimaging. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(31), 8151-8155.

- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8(5), 353-367.
- Lobner, D. (2000). Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?. *Journal of neuroscience methods*, 96(2), 147-152.
- Marmioli, P., & Cavaletti, G. (2012). The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. *Current medicinal chemistry*, 19(9), 1269-1276.
- Meikle, T., & Stevens, R. (1978).  $\beta$ -Tricarbonyl compounds. Part 1. Synthesis of the antibiotics uliginosin A, dihydrouliginosin B, and analogues thereof. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (11), 1303-1312.
- Meldrum, B. S., & Rogawski, M. A. (2007). Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics*, 4(1), 18-61.
- Morimoto, K., Fahnstock, M., & Racine, R. J. (2004). Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. *Progress in neurobiology*, 73(1), 1-60.
- Moze, E., Hunya, A., Posa, A., Penke, B., & Datki, Z. (2012). A novel method for the rapid determination of beta-amyloid toxicity on acute hippocampal slices using MTT and LDH assays. *Brain research bulletin*, 87(6), 521-525.
- Müller, M. O. (2013). *Introduction* (pp. 3-25). Springer Berlin Heidelberg.
- Mussulini, B. H. M., Leite, C. E., Zenki, K. C., Moro, L., Baggio, S., Rico, E. P., ... & de Oliveira, D. L. (2013). Seizures induced by pentylentetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. *PloS one*, 8(1), e54515.
- Nakken, K. O., Heuser, K., Alfstad, K., & Taubøll, E. (2014). [How do antiepileptic drugs work?]. *Tidsskrift for den Norske laegeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny række*, 134(1), 42-46.
- Niciu, M. J., Kelmendi, B., & Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 100(4), 656-664.
- Noebels, J., Avoli, M., Rogawski, M., Olsen, R., & Delgado-Escueta, A. (Eds.). (2012). *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*. Oxford University Press.
- Olah, G. A., Tolgyesi, W. S., Kuhn, S. J., Moffatt, M. E., Bastien, I. J., & Baker, E. B. (1963). Stable carbonium ions. IV. 1a Secondary and tertiary alkyl and aralkyl oxocarbenium hexafluoroantimonates. Formation and identification of the trimethylcarbonium ion by decarbonylation of the tert-butyl oxocarbenium ion. *Journal of the American Chemical Society*, 85(9), 1328-1334.
- Oliveira, T. A., Koakoski, G., Kreutz, L. C., Ferreira, D., da Rosa, J. G. S., de Abreu, M. S., ... & Barcellos, L. J. G. (2013). Alcohol impairs predation risk response and communication in zebrafish. *PloS one*, 8(10), e75780.



- Ozawa, S., Kamiya, H., & Tsuzuki, K. (1998). Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology*, 54(5), 581-618.
- Patidar, Y., Gupta, M., Khwaja, G. A., Chowdhury, D., Batra, A., & Dasgupta, A. (2013). Clinical profile of psychogenic non-epileptic seizures in adults: A study of 63 cases. *Annals of Indian Academy of Neurology*, 16(2), 157.
- Perez-Mendes, P., Blanco, M. M., Calcagnotto, M. E., Cinini, S. M., Bachiega, J., Papoti, D., ... & Mello, L. E. (2011). Modeling epileptogenesis and temporal lobe epilepsy in a non-human primate. *Epilepsy research*, 96(1), 45-57.
- Peterson, G.L., 1977, A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83, 346.
- Petroff, O. A., Errante, L. D., Rothman, D. L., Kim, J. H., & Spencer, D. D. (2002). Neuronal and glial metabolite content of the epileptogenic human hippocampus. *Annals of neurology*, 52(5), 635-642.
- Pin, J. P., & Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34(1), 1-26.
- Pitkänen, A., Immonen, R. J., Gröhn, O. H., & Kharatishvili, I. (2009). From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia*, 50(s2), 21-29.
- Rates, S. M. K., Von Poser, G. L., Viana, A. F., Costentin, J., & Do Rego, J. C. (2010). *U.S. Patent Application 13/148,750*.
- Rheims, S., & Ryvlin, P. (2013). Profile of perampanel and its potential in the treatment of partial onset seizures. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 9, 629.
- Rico, E.P., de Oliveira, D.L., Rosemberg, D.B., Mussulini, B.H., Bonan, C.D., Dias, R.D., Wofchuk, S., Souza, D.O., Bogo, M.R., 2010. Expression and functional analysis of Na(+)-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. *Brain Res Bull.* 81(4-5),517-23.
- Rogawski, M. A., & Löscher, W. (2004). The neurobiology of antiepileptic drugs. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(7), 553-564.
- Rosemberg, D. B., Rico, E. P., Mussulini, B. H. M., Piato, Â. L., Calcagnotto, M. E., Bonan, C. D., ... & de Oliveira, D. L. (2011). Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS One*, 6(5), e19397.
- Santana, S., Rico, E. P., & Burgos, J. S. (2012). Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer's disease?. *American journal of neurodegenerative disease*, 1(1), 32.
- Scharfman, H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 7(4), 348-354.

Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Capovilla, G., & Connolly, M. B. (2014). The organization of the epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. *ILAE website*.

Schousboe, A., & Waagepetersen, H. S. (2005). Role of astrocytes in glutamate homeostasis: implications for excitotoxicity. *Neurotoxicity research*, 8(3-4), 221-225.

Shapiro, L. A., Wang, L., & Ribak, C. E. (2008). Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia*, 49(s2), 33-41.

Sharma, A. K., Reams, R. Y., Jordan, W. H., Miller, M. A., Thacker, H. L., & Snyder, P. W. (2007). Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicologic pathology*, 35(7), 984-999.

Sheldon, A. L., & Robinson, M. B. (2007). The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochemistry international*, 51(6), 333-355.

Sidoryk-Wegrzynowicz, M., & Aschner, M. (2013). Role of astrocytes in manganese mediated neurotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 14(1), 23.

Singh, I. P., & Bharate, S. B. (2006). Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural product reports*, 23(4), 558-591.

Singh, I. P., Sidana, J., Bansal, P., & Foley, W. J. (2009). Phloroglucinol compounds of therapeutic interest: global patent and technology status.

Sobrado, M., Roda, J. M., López, M. G., Egea, J., & Garcia, A. G. (2004). Galantamine and memantine produce different degrees of neuroprotection in rat hippocampal slices subjected to oxygen–glucose deprivation. *Neuroscience letters*, 365(2), 132-136.

Specchio, L. M., Iudice, A., Specchio, N., La Neve, A., Spinelli, A., Galli, R., ... & Murri, L. (2004). Citalopram as treatment of depression in patients with epilepsy. *Clinical neuropharmacology*, 27(3), 133-136.

Stein, A. C., Viana, A. F., Müller, L. G., Nunes, J. M., Stolz, E. D., Do Rego, J. C., ... & Rates, S. M. (2012). Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: a promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behavioural brain research*, 228(1), 66-73.

Stern, H. M., & Zon, L. I. (2003). Cancer genetics and drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Cancer*, 3(7), 533-539.

Stewart, A., Wu, N., Cachat, J., Hart, P., Gaikwad, S., Wong, K., ... & Kalueff, A. V. (2011). Pharmacological modulation of anxiety-like phenotypes in adult zebrafish behavioral models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35(6), 1421-1431.

Sylvester, P. W. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. In *Drug Design and Discovery* (pp. 157-168). Humana Press.

Vascotto, S.G., Beckham, Y. Kelly, G.M., 1997. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology. *Biochem Cell Biol.* 75 (5), 479-485

Viana, A., do Rego, J. C., von Poser, G., Ferraz, A., Heckler, A. P., Costentin, J., & Rates, S. M. K. (2005). The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology*, 49(7), 1042-1052.

Wang, J., Sun, P., Bao, Y., Dou, B., Song, D., & Li, Y. (2012). Vitamin E renders protection to PC12 cells against oxidative damage and apoptosis induced by single-walled carbon nanotubes. *Toxicology in Vitro*, 26(1), 32-41.

Wolman, M., & Granato, M. (2012). Behavioral genetics in larval zebrafish: Learning from the young. *Developmental neurobiology*, 72(3), 366-372.

Wong, K., Stewart, A., Gilder, T., Wu, N., Frank, K., Gaikwad, S., ... & Kalueff, A. V. (2010). Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. *Brain research*, 1348, 209-215.

Yoshida, S., Ujiie, M., Takahashi, N., Bolte, M. L., & Crow, W. D. (1985). Synthesis of deuterated grandinol. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(1), 211-213.

Yuste, F., Sánchez-Obregón, R., & Walls, F. (1978). The synthesis of grandinol. *Tetrahedron letters*, 19(49), 4869-4870.

Zhang, W., Huguenard, J. R., & Buckmaster, P. S. (2012). Increased excitatory synaptic input to granule cells from hilar and CA3 regions in a rat model of temporal lobe epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, 32(4), 1183-1196.



# 7. ANEXOS

## 7.1. ESPECTROS DE RMN $^1\text{H}$

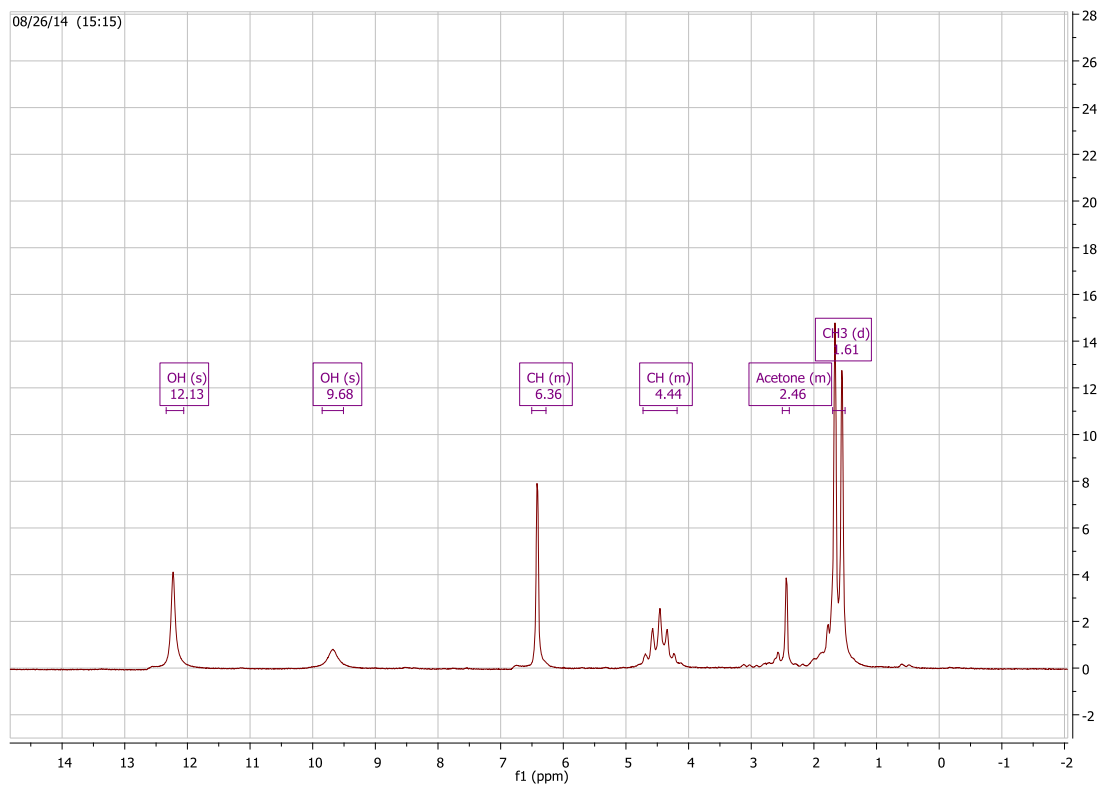


FIGURA 18: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **7**.

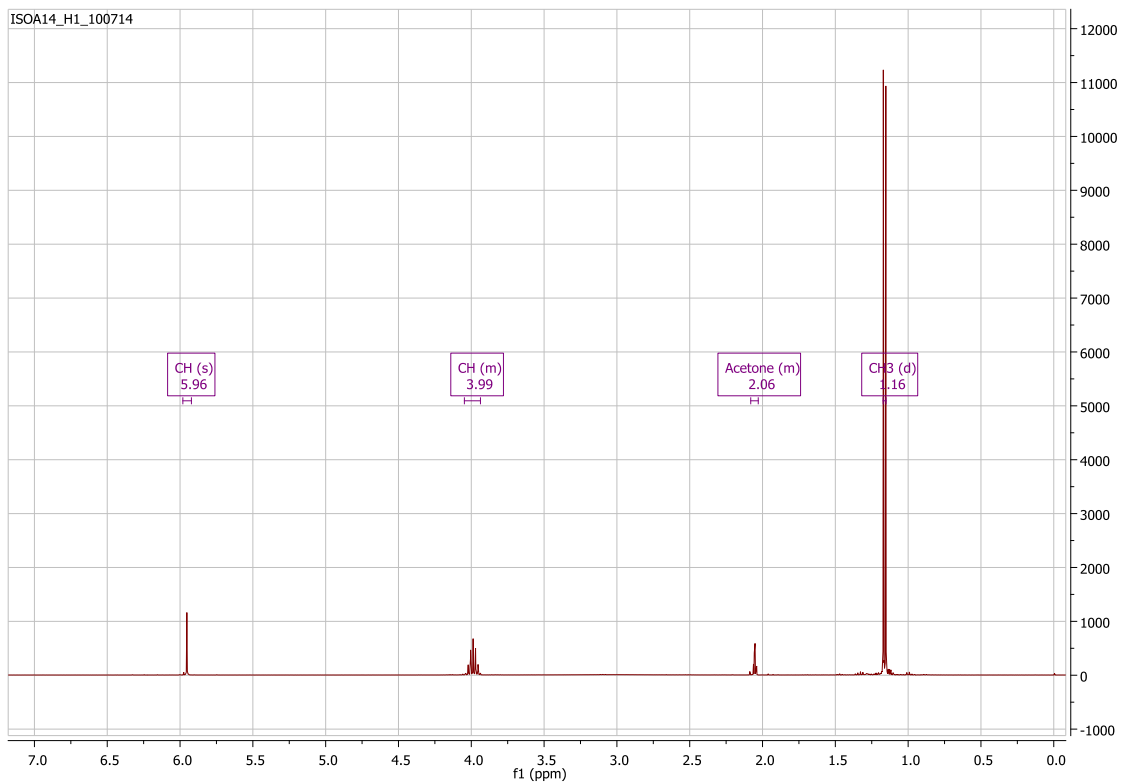


FIGURA 19: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **8**.

Composto **8**.

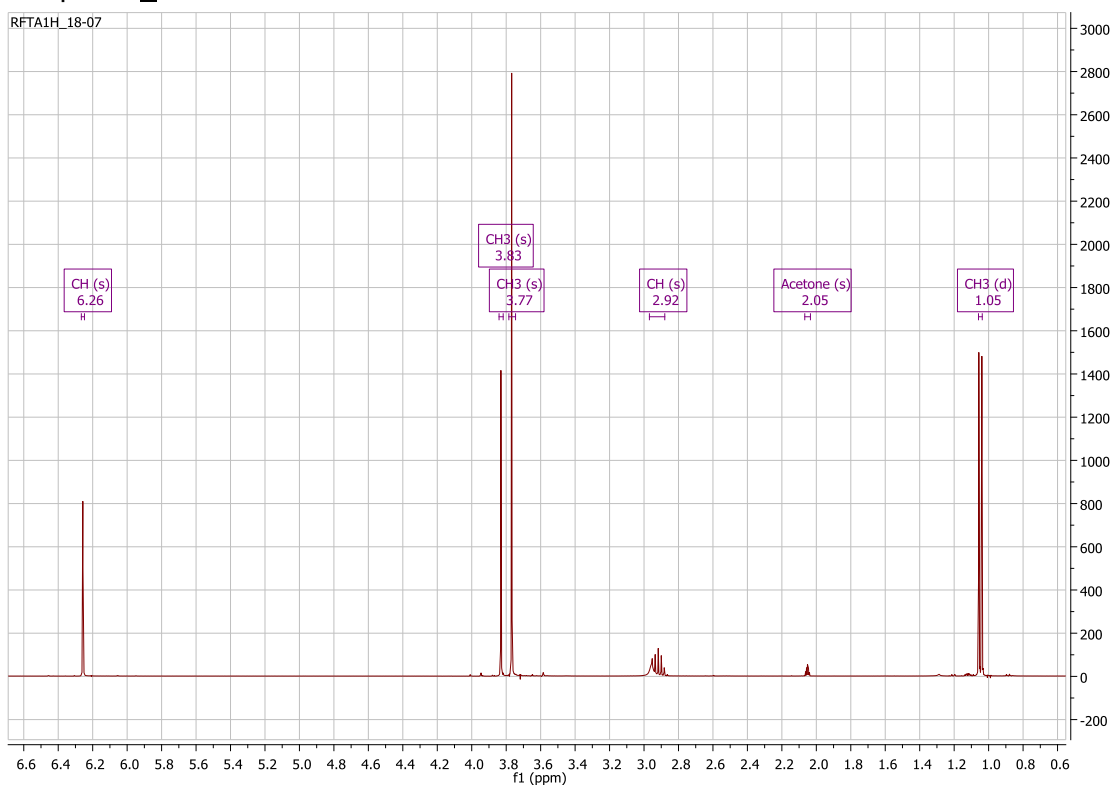


FIGURA 20: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **9**.

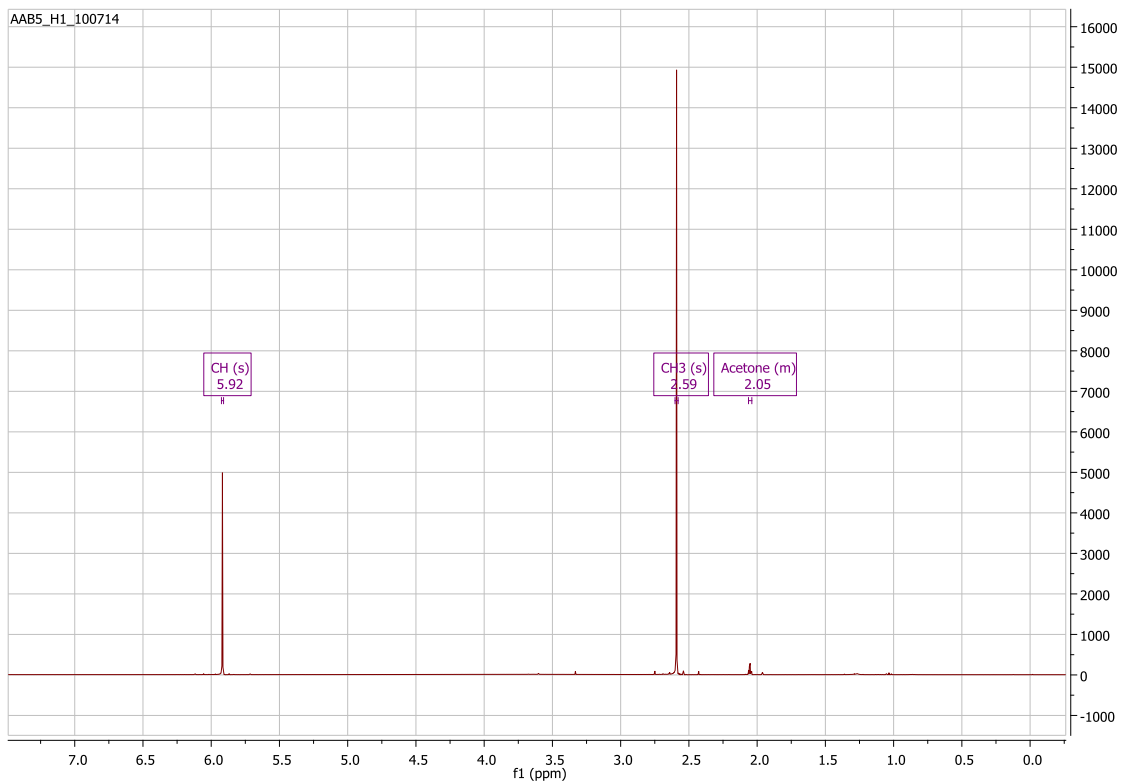


FIGURA 21: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto **10**.

## 7.1. ESPECTROS DE RMN $^{13}\text{C}$

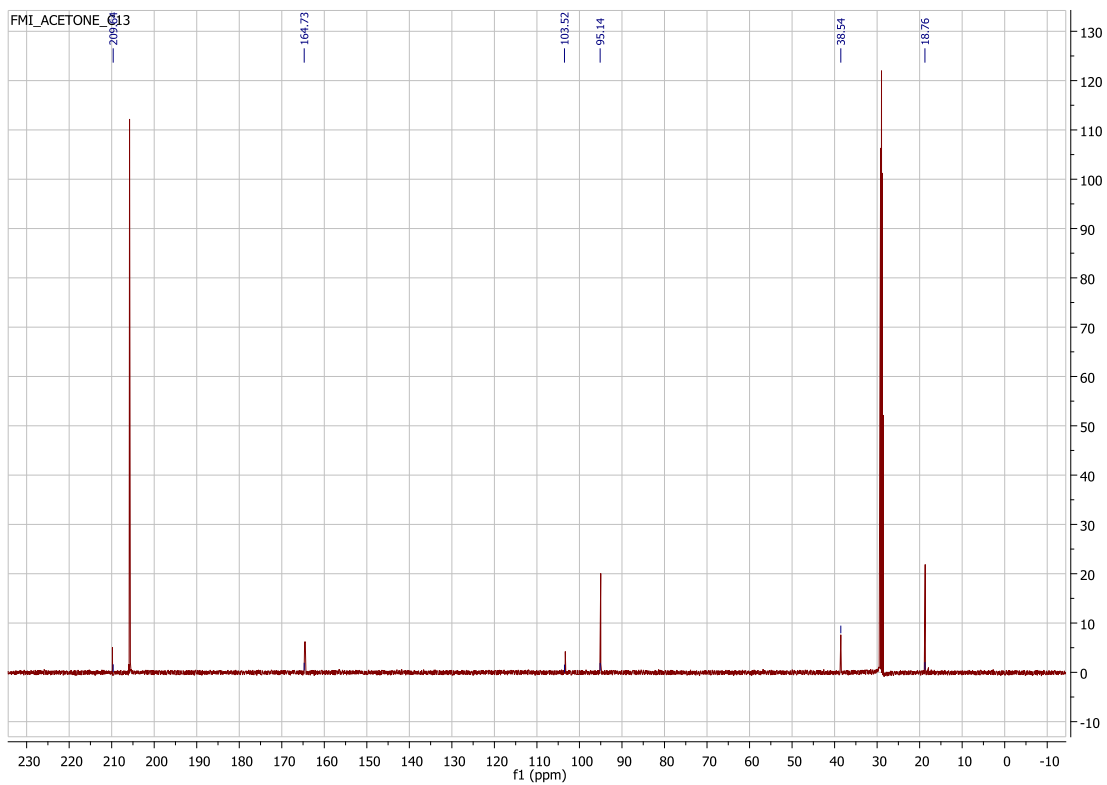


FIGURA 22: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **7**.

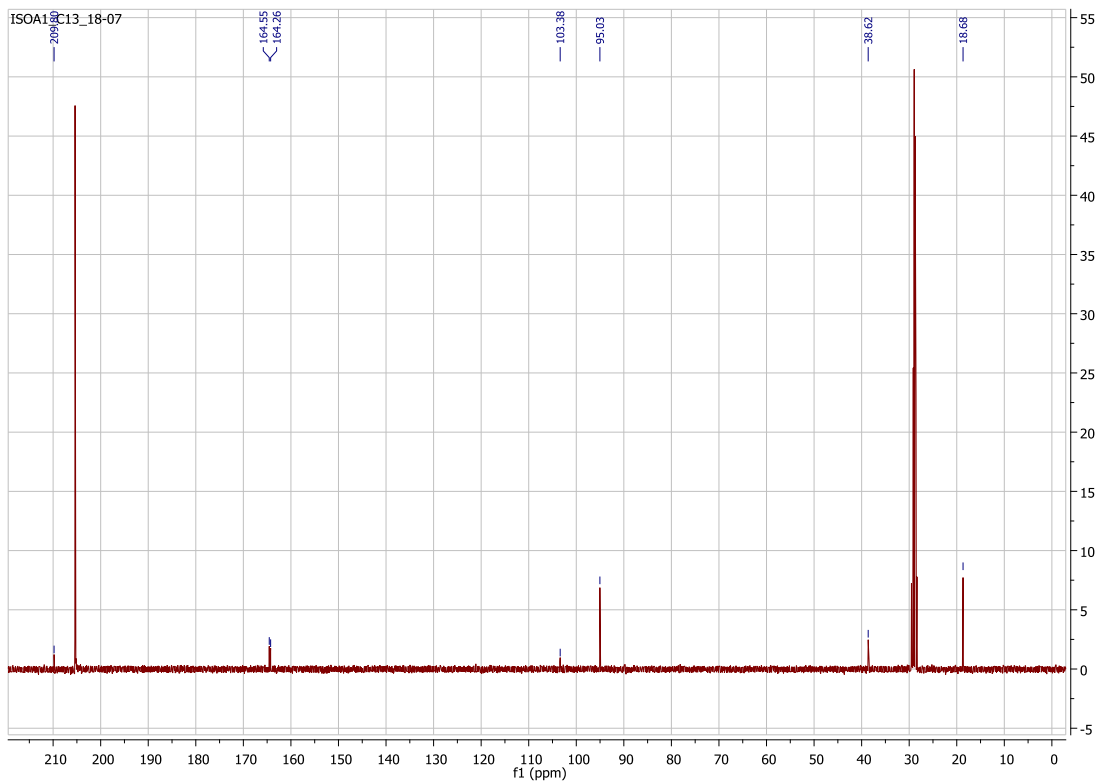


FIGURA 23: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **8**.

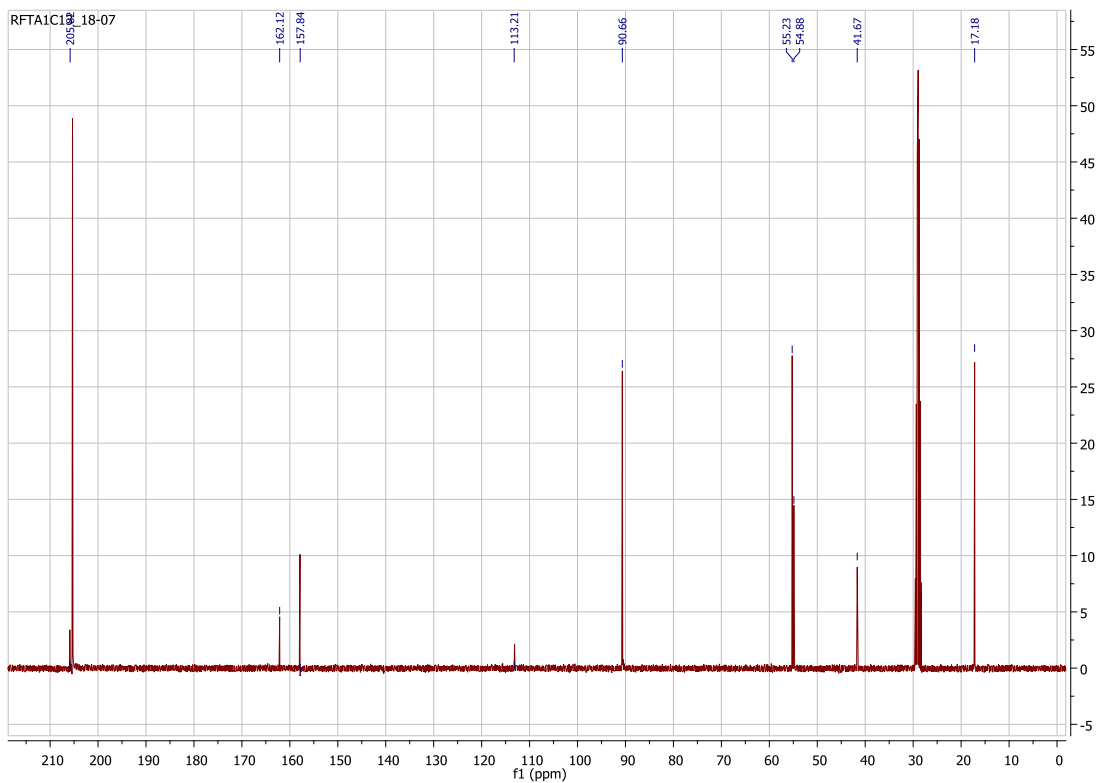


FIGURA 24: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **9**.



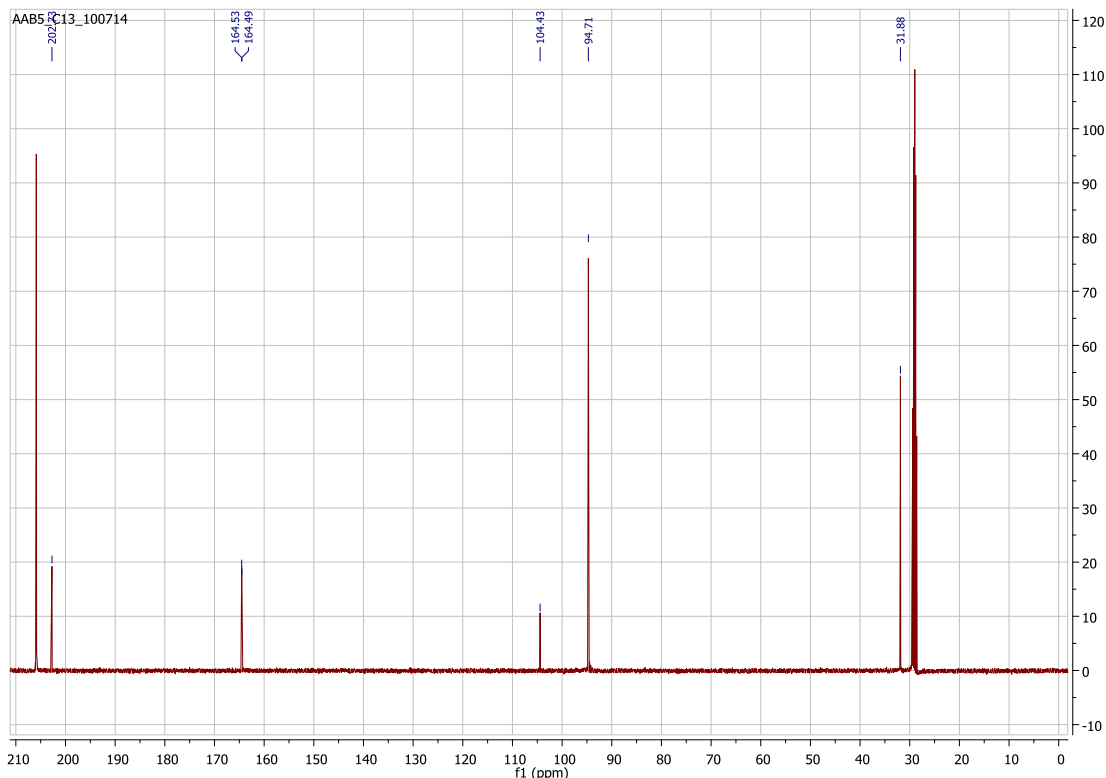


FIGURA 25: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto **10**.

### 7.3. COMITÊ DE ÉTICA



**UFRGS**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**  
Comissão De Ética No Uso De Animais



#### CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 27006

**Título:** INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS DO FLOROGLUCINOL E DERIVADOS SINTÉTICOS EM ZEBRAFISH (DANIO RERIO) VISANDO A ATIVIDADE ANTICONSULSIVANTE

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

GRACE GOSMANN - coordenador desde 19/04/2014  
DIOGO LOSCH DE OLIVEIRA - coordenador desde 19/04/2014  
Ben Hur Marins Mussulini - Aluno de Doutorado desde 19/04/2014  
SORAIA LUNARDELLI - Aluno de Mestrado desde 19/04/2014  
Aline Irala Vieira - Aluno de Doutorado desde 19/04/2014

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 816 Zebrafish adultos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.**

Porto Alegre, Quinta-Feira, 10 de Julho de 2014

STELA MARIS KUZE RATES  
Coordenador da comissão de ética

FIGURA 26: Parecer do Comitê de Ética para o Uso de Animais.