

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

SÍNTESE DE DERIVADOS DO FLOROGLUCINOL E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS

DOUTORANDA: Mônica Oliveira Duarte

ORIENTADORA: Dr. Grace Gosmann

PORTO ALEGRE, NOVEMBRO DE 2012.



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

SÍNTESE DE DERIVADOS DO FLOROGLUCINOL E ATIVIDADES  
BIOLÓGICAS

Tese apresentada pela doutoranda Mônica Oliveira  
Duarte como requisito parcial para a obtenção  
do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Dr. Grace Gosmann  
PORTO ALEGRE, NOVEMBRO DE 2012.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 01 de novembro de 2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Gustavo Henrique Goulart Trossini

Universidade de São Paulo

#### CIP - Catalogação na Publicação

Duarte, Mônica Oliveira  
SÍNTESE DE DERIVADOS DO FLOROGLUCINOL E  
ATIVIDADES BIOLÓGICAS / Mônica Oliveira Duarte. --  
2012.  
212 f.

Orientadora: Grace Gosmann.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Síntese. 2. Depressão. 3. TSC. 4. Doença de Alzheimer. 5. GSK beta. I. Gosmann, Grace, orient.  
II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica e Síntese Orgânica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com a colaboração do Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS, coordenado pela Prof. Dr. Stela M. K. Rates, e do Grupo de Neurofármacos, coordenado pela Prof. Dr. Ana Martínez, do Instituto de Química Médica pertencente ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) situado em Madrid-Espanha, com apoio financeiro do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, Acordo CAPES/COFECUB nº 656/09 e CNPq. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES, do CNPq e no Estágio de doutorado no exterior recebeu bolsa CAPES/PDSE-Processo 4610/11-3.



" Once we accept our limits, we go beyond them. "

Albert Einstein



## Agradecimentos

- A Deus, por tudo.
- Aos meus pais, pelo amor, carinho e principalmente pelos valores ensinados.
- Ao meu marido Mateus, pelo amor e apoio incondicionais.
- Ao meu filho José Antonio, que está a caminho, ainda na minha barriga, e que já faz tudo valer a pena.
- Aos amigos-irmãos, os de longa data e os que conheci ao longo desse caminho trilhado na Universidade.
- À orientadora no Brasil pelo convite e pela confiança depositada em mim.
- Às orientadoras no Exterior (CSIC), Ana Martinez e Carmen Gil, por me proporcionarem uma boa integração ao grupo e novos conhecimentos.
- Aos colegas da UFRGS e do CSIC, pelo companheirismo, apoio e troca de conhecimentos.
- Ao Dr. Daniel Perez, pela supervisão nos ensaios de PAMPA, e à Dra. Concepción Perez, nos ensaios biológicos.
- Ao Dr. Ignacio Soteras pela parte computacional.
- Às centrais analíticas do CSIC e dos Institutos de Química da USP e da UFRGS pelas análises realizadas neste trabalho.
- Ao LAPPS pelo aparelho de ponto de fusão.



## Resumo

A depressão, um transtorno de origem neurológica, atinge cerca de 21% da população mundial. Já a Doença de Alzheimer afeta 10% dos indivíduos com idade superior a 65 anos e 50% dos que possuem idade superior a 85 anos. A atividade do *Hypericum perforatum*, utilizada na medicina popular, deve-se principalmente à presença da hiperforina, um derivado acilfloroglucinol. Objetivou-se neste trabalho desenvolver compostos sintéticos, a partir da simplificação estrutural, a partir da molécula da uliginosina B, um derivado natural do floroglucinol que apresenta atividade do tipo antidepressiva. Dos compostos sintetizados utilizando a síntese clássica e a metodologia de microondas, dezenove tiveram sua estrutura química completamente elucidada. O grande desafio foi encontrar protocolos de síntese adequados para obter os produtos com bons rendimentos e menor formação de subprodutos. O uso de microondas foi uma ferramenta importante na síntese de alguns compostos isoprenilados. Dez compostos foram testados em dose equimolar à imipramina (20 mg/kg) no teste de suspensão pela cauda (TSC) e, destes, sete compostos diminuíram o tempo de imobilidade dos animais quando comparados aos controles positivos imipramina e fluoxetina, sem provocar qualquer alteração na locomoção no teste de campo aberto. Para avaliar o potencial terapêutico para a Doença de Alzheimer foram realizados ensaios de inibição da acetilcolinesterase e da butirilcolinesterase, nos quais a maioria dos compostos mostrou-se seletivo para a inibição da acetilcolinesterase, porém com atividade na faixa de micromolar. A atividade antioxidante também foi avaliada, na qual a maioria apresentou uma atividade menor que a do floroglucinol. Os compostos ativos no TSC foram avaliados frente à proteína GSK-3 $\beta$  e dois apresentaram uma atividade moderada ATP não competitiva. Foi realizado o *docking* destas duas moléculas sobre a proteína GSK-3 $\beta$  e pode-se constatar que existe uma ligação aos sítios do substrato (cavidade dois) e alostérico (cavidade sete), o que confirma o resultado obtido experimentalmente no ensaio de cinética com o substrato GS2. As atividades biológicas apresentadas pelos derivados sintéticos obtidos são inovadoras, já que até o momento estudos semelhantes a estes não são encontrados na literatura. Sendo assim, este trabalho se torna um ponto de partida para novos estudos com derivados do floroglucinol na busca de novos protótipos para as atividades antidepressiva e neuroprotetora.

**Palavras-chave:** Floroglucinol, Depressão, TSC, Doença de Alzheimer, GSK-3 $\beta$ .



## Abstract

Depression, a neurological disorder, affects about 21% of the world population, and Alzheimer's Disease affects 10% of individuals aged 65 years and 50% of those with age above 85 years. The activity of *Hypericum perforatum*, used in folk medicine, is mainly due to the presence of hyperforin, an acylphloroglucinol. The aim of this work was to develop synthetic compounds using uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative having antidepressant-like activity, as a prototype to the structural simplification strategy. Nineteen compounds were synthesized using classical synthesis and the microwave assisted organic synthesis, which structures were fully characterized. The challenge was to develop synthetic protocols to obtain compounds with good yields and few by-products. The microwave assisted organic synthesis was an important tool to obtain some isoprenylated compounds. Ten compounds were tested in equimolar doses to imipramine (20 mg/kg) in the tail suspension test (TST), from which seven decreased the immobility time of the animals when compared to positive controls, imipramine and fluoxetine, without any change at the locomotion in the open field test. To evaluate the therapeutic potential for Alzheimer's Disease the inhibition assays of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase were performed. The majority of compounds were selective for acetylcholinesterase inhibition in the range of micromolar. The antioxidant activity was also assessed for all compounds which presented lower activity than that of the phloroglucinol. The active compounds in the TSC were tested against the GSK-3 $\beta$  protein and two showed a moderate ATP noncompetitive activity. The docking of these molecules was performed on GSK-3 $\beta$  protein and showed a binding to the site of the substrate (cavity two) and to the allosteric one (cavity seven), which confirms the results obtained on the GS2 substrate kinetic assay. The biological activities demonstrated by the synthetic derivatives obtained herein are innovative since there are not similar studies in the literature. Thus, this work is a starting point for further studies with phloroglucinol derivatives in a search of new prototypes for antidepressant and neuroprotective activities.

**Keywords:** Phloroglucinol, Depression, TSC, Alzheimer's disease, GSK-3 $\beta$ .



## Lista de figuras

Figura 1: Estrutura do Floroglucinol 1. ....	30
Figura 2: Estruturas dos compostos drumondina A-F (9-14), isodrumondina D 15 e albaspidina A-A 16 e P-P 17, isolados de <i>Hypericum drummondii</i> . ....	32
Figura 3: Estruturas dos compostos sarotraleno C 18 e sarotraleno D 19, isolados de <i>Hypericum japonicum</i> . ....	33
Figura 4: Estruturas dos compostos flavesona 20, composto 21 e sarotraleno B 22, isolados de <i>Hypericum japonicum</i> . ....	33
Figura 5: Estruturas dos compostos papuaforinas A-E (23-27), hiperguionas A 28 e B 30 e seus tautômeros 29 e 31 e a hiperpapuanona 32 e seu tautômero 33, isolados do <i>Hypericum papuanum</i> . ....	34
Figura 6: Estruturas dos compostos ialibionas A-E e seus tautômeros (34-43), isolados de <i>Hypericum papuanum</i> . ....	35
Figura 7: Estruturas dos compostos erectquiona A-C (44-46), otogirina 47 e otogirona 48, isolados do <i>Hypericum erectum</i> . ....	36
Figura 8: Estruturas dos compostos erectonas A 49 e B 50, isolados do <i>Hypericum erectum</i> . ....	36
Figura 9: Estruturas dos tautômeros hiperatomarina a-b (51-52) isolados do <i>Hypericum atomarium</i> . ....	37
Figura 10: Estruturas dos compostos hiperjovinol A 53 e B 54 e dos compostos 55-58, isolados do <i>Hypericum jovis</i> . ....	38
Figura 11: Estruturas dos compostos hiperbrasilol B 59, isolado do <i>Hypericum caprifoliatum</i> e uliginosina B 60, isolado do <i>H. carinatum</i> e <i>H. polyanthemum</i> . ....	39
Figura 12: Estruturas dos compostos HP1 61, HP2 62, HP3 63, uliginosina B 60 e japonicina A 64, isolados do <i>H. polyanthemum</i> e <i>H. myrianthum</i> . ....	39
Figura 13: Estruturas dos compostos tameonas A-H (65-72), isolados do <i>Hypericum ascyron</i> . ....	40
Figura 14: Estruturas dos compostos petiolinas A (73-74) e B (75-76) na forma de tautômeros e petiolinas C-M (77- 87), isolados do <i>Hypericum pseudopetiolum</i> . ....	41

Figura 15: Estruturas dos compostos empetrifelixina A-D (88-91), empetrikajaforina 92 e os monocíclicos 92-96, isolados do <i>Hypericum empetrifolium</i> .....	42
Figura 16: Estruturas dos compostos hipericina 97, hiperosídeo 98 e hiperforina 99, presentes no <i>Hypericum perforatum</i> . ....	43
Figura 17: Estrutura proposta para o composto HC-1 100.....	44
Figura 18: Estruturas das uliginosinas A 101 e B 60, extraídas do gênero <i>Hypericum</i> . ....	44
Figura 19: Estrutura do derivado da hiperforina, IDN 5706 102. ....	45
Figura 20: Estrutura do floroglucinol e as posições de substituição propostas neste trabalho. ....	69
Figura 21: Estruturas dos compostos 124 e 129.....	73
Figura 22: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 60MHz) do composto 124. ....	74
Figura 23: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) do composto 124. ....	74
Figura 24: Estrutura dos compostos 8, 124, 129 e 142. ....	79
Figura 25: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) do composto 142. ....	79
Figura 26: Estrutura do composto 147. ....	82
Figura 27: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (acetona- $\text{d}_6$ , 75MHz) do composto 147. ....	83
Figura 28: Estrutura dos compostos 125 e 150. ....	84
Figura 29: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) do composto 125. ....	85
Figura 30: Estruturas dos compostos 148 e 149.....	85
Figura 31: Estrutura do composto 151. ....	87
Figura 32: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 20 MHz) do composto 151. ....	87
Figura 33: Estruturas do compostos 152 e 154. ....	88
Figura 34: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) do composto 154. ....	89
Figura 35: Estrutura dos compostos 153 e 155. ....	89
Figura 36: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) do composto 153. ....	90
Figura 37: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) do composto 155. ....	90

Figura 38: Estruturas dos compostos dímeros 156, 157 e 158.....	93
Figura 40: Estruturas dos compostos testados no TSC. ....	136
Figura 41: Efeito da administração oral aguda de imipramina (20 mg/kg), fluoxetina (30 mg/kg), dos compostos sintéticos 1, 8, 124, 129, 142, 151, 153, 156, 157 e 158 e do controle salina em camundongos no teste de suspensão pela cauda (TSC). Cada coluna representa a mediana e o intervalo interquartil $Q_{25}$ - $Q_{75}$ (n=10-14 animais/grupo). Análise de Variância <i>on Ranks</i> Kruskal-Wallis seguida pelo método de Dunn's: *p<0,05 quando comparado com o grupo salina. ....	138
Figura 42: Efeito do tratamento oral em camundongos com os compostos 8, 124, 142, 153, 156, 157 e 158 no teste do campo aberto. Cada coluna representa a mediana e o intervalo interquartil $Q_{25}$ - $Q_{75}$ (n=9-11 animais/grupo). Análise de Variância <i>on Ranks</i> Kruskal-Wallis. Nenhuma diferença foi encontrada quando comparado com o grupo salina, P=0,084. ....	141
Figura 43: Estrutura dos compostos tacrina 161, donepezil 162, rivastigmina 163, galantamina 164 e memantina 165. ....	169
Figura 44: Gráfico da correlação estabelecida entre os valores de permeabilidade encontrados em literatura e os obtido experimentalmente. ....	178
Figura 45: Gráfico da avaliação da proteção do dano inflamatório produzido por LPS em células RAW 264.7.....	182
Figura 46: Gráficos do ensaio de competição do ATP com os compostos 156 e 158. ....	186
Figura 47: Gráficos do ensaio de competição entre o substrato GS2 e os compostos 156 e 158. ....	187
Figura 48: Cavidades presentes na superfície de GSK3- $\beta$ . Vista anterior (esquerda) e posterior (direita). ....	188
Figura 49: Interações presentes nos melhores modos de união obtidos para os compostos 156 (esquerda) e 158 (direita) com a estrutura 1PYX na cavidade do substrato (cavidade 2). Distâncias em angstroms.....	191
Figura 50: Interações presentes nos melhores modos de união obtidos para os compostos 156 (esquerda) e 158 (direita) com a estrutura 1I09, para o sítio alostérico (cavidade sete). Distâncias em angstroms. ....	192

Figura 51: Comparação dos modos de união focados na cavidade do substrato obtidos com Autodock para os compostos 156 (ciano) e 158 (magenta) na presença de HEPES (azul escuro) na estrutura 1H8F. .... 194

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Acilação de Friedel-Crafts na presença de cloreto de alumínio para obtenção de 124 e 129. ....	72
Tabela 2: Acilação de Friedel-Crafts na presença de cloreto de alumínio para obtenção de 8 e 142. ....	75
Tabela 3: Acilação na presença de óxido de zinco para obtenção de 124 e 129..	76
Tabela 4: Acilação na presença de pentóxido de nióbio para obtenção de 124 e 129. ....	77
Tabela 5: Acilação na presença de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ para obtenção de 8, 124, 129 e 142. ....	78
Tabela 6: Acilação do trimetoxibenzeno para obtenção de 147.....	81
Tabela 7: Antidepressivos utilizados na terapêutica atual (tabela adaptada de Chopra, 2011). ....	127
Tabela 8: Modelos animais utilizados para avaliar atividade antidepressiva (tabela adaptada de Chopra, 2011). ....	132
Tabela 9: Medianas do tempo de imobilidade no TSC (em segundos).....	137
Tabela 10: Valores de $\text{CE}_{50}$ dos derivados do floroglucinol para a acetilcolinesterase e butirilcolinesterase.....	171
Tabela 11: Atividade antioxidante dos derivados do floroglucinol .....	175
Tabela 12: Permeabilidade ( $P_e \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ ) no ensaio PAMPA-BBB de 10 fármacos comerciais e dos derivados do floroglucinol. ....	179
Tabela 13: Resultados obtidos no ensaio com GSK-3 $\beta$ . ....	185
Tabela 14: energias de binding obtidas com Autodock para cada ligando em cada estrutura (kcal/mol).....	189
Tabela 15: Distâncias (Å) das possíveis pontes de hidrogênio entre os inibidores e a enzima, segundo o modo de união obtido para a cavidade dois. ....	191
Tabela 16: Pontes de hidrogênio para os modos de união dos compostos 156 e 158 na estrutura 1I09. Distâncias em angstroms. ....	192

Tabela 17: Energias de interação (kcal/mol) das melhores soluções obtidas com Autodock para os compostos 156 e 158. a: Estrutura 1PYX. b: Estructura 1H8F  
..... 193

## Lista de abreviaturas

5HT- Serotonina

AChE- Acetilcolinesterase

AcOH- Ácido acético

APoE- Apolipoproteína

APP- Proteína precursora de amilóide

ASC- Área sob a curva

ATTC- *American Type Culture Collection*

ATP- Trifosfato de adenosina

AVC- Acidente vascular cerebral

BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro

BuChE- Butirilcolinesterase

CCD- Cromatografia em camada delgada

CD<sub>3</sub>OD- Metanol deuterado

CDCl<sub>3</sub>- Clorofórmio deuterado

CH<sub>3</sub>CN- Acetonitrila

CIM- Concentração inibitória mínima

COX- Cicloxigenase

DA- Doença de Alzheimer

DAYLY- Disability adjusted life years

DCM- Diclorometano

DDQ- 2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona

DMSO- Dimetilsulfóxido

DSM-IV- Manual diagnóstico e estatístico IV edição

CE<sub>50</sub>- Concentração efetiva 50%

Eq.- Equivalente

GABA- Ácido gama aminobutírico

GS2- Peptídeo glicogênio sintase-2  
GSK- Glicogênio sintase quinase  
HPA- Hipotálamo-pituitária-adrenal  
HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência  
i.p.- Intraperitoneal  
IC<sub>50</sub>- Concentração necessária para inibir 50% da atividade máxima  
LOX- Lisil oxidase  
MAO- Monoaminoxidase  
MOM-Cl- Éter clorometil metílico  
NA- Noradrenalina  
OMS- Organização Mundial da Saúde  
ORAC- Oxygen radical absorbance capacity  
PAMPA- Permeabilidade de membrana artificial paralela  
PBS- Buffer salino fosfato  
PET- Tomografia axial de pósitrons  
RMN- Ressonância Magnética Nuclear  
ROS- Substâncias reativas de oxigênio  
SEPCT- Tomografia computadorizada de fóton único  
SNC- Sistema Nervoso Central  
t.a.- Temperatura ambiente  
THF- Tetrahidrofurano  
TNF- Teste de natação forçada  
TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral  
TSC- Teste de suspensão pela cauda  
U.V.- Ultravioleta  
v.o.- Via oral

## Sumário

1	Introdução Geral .....	29
1.1	Biossíntese dos derivados do floroglucinol .....	30
1.2	Derivados do floroglucinol em diferentes espécies de <i>Hypericum</i> .....	31
1.2.1	<i>Hypericum</i> e atividade antidepressiva.....	42
1.2.2	Derivados de floroglucinol e a Doença de Alzheimer .....	45
1.3	A Depressão e a Doença de Alzheimer .....	45
1.4	Referências.....	49
2	Objetivos.....	57
2.1	Capítulo 1: Síntese de derivados do Floroglucinol.....	57
2.2	Capítulo 2: Avaliação da atividade antidepressiva através do teste de suspensão pela cauda (TSC) e teste de campo aberto.....	57
2.3	Capítulo 3: Avaliação terapêutica dos derivados do floroglucinol para a Doença de Alzheimer .....	57
3	Capítulo 1- Síntese de Derivados do Floroglucinol.....	61
3.1	Introdução .....	61
3.2	Planejamento: simplificação estrutural .....	68
3.3	Objetivo Específico.....	69
3.4	Reações de Acilação .....	69
3.4.1	Resultados e Discussão .....	71
3.5	Reação de Proteção das Hidroxilas.....	80
3.5.1	Acilação do composto 146 .....	80
3.5.2	Desproteção das hidroxilas do derivado do trimetoxibenzeno .....	83
3.6	Reações de alquilação .....	84
3.6.1	Reações de alquilação em presença de iodometano.....	84
3.6.2	Reações de alquilação na presença de brometo de isoprenila.....	86

3.7	Reação de condensação.....	92
3.8	Conclusão.....	97
3.9	Parte Experimental.....	99
3.9.1	Equipamentos e técnicas .....	99
3.10	Parte Experimental de Síntese .....	101
3.10.1	Síntese do Composto Metoxilado .....	101
3.10.2	Síntese dos Compostos Acilados .....	101
3.10.3	Síntese dos Compostos Diacilados Alquilados .....	105
3.10.4	Síntese dos Compostos Isoprenilados .....	107
3.10.5	Síntese dos Compostos Dímeros .....	111
3.11	Referências.....	115
4	Capítulo 2- Ensaios farmacológicos para atividade antidepressiva.....	121
4.1	Introdução .....	121
4.2	Patologia da Depressão .....	122
4.3	Diagnóstico .....	125
4.4	Tratamento .....	127
4.5	Estudo de espécies de <i>Hypericum</i> .....	130
4.6	Modelos animais .....	132
4.7	Objetivos específicos .....	135
4.8	Planejamento do experimento.....	135
4.9	Resultados e discussão .....	137
4.10	Conclusões .....	143
4.11	Parte Experimental.....	145
4.11.1	Animais .....	145
4.11.2	Considerações Éticas.....	145
4.11.3	Tratamentos.....	146

4.11.4	Estatística .....	146
4.11.5	Avaliação da atividade antidepressiva pelo TSC .....	146
4.11.6	Avaliação da atividade locomotora (teste do campo aberto) .....	146
4.11.7	Análise estatística .....	147
4.12	Referências .....	149
5	Capítulo 3: Avaliação do potencial terapêutico dos derivados de floroglucinol para a Doença de Alzheimer .....	159
5.1	Dados da OMS .....	159
5.2	Patologia .....	159
5.2.1	Hipótese colinérgica .....	161
5.2.2	Hipótese amilóide .....	162
5.2.3	Hipótese da proteína tau .....	163
5.2.4	Hipótese viral .....	163
5.2.5	Antioxidantes e antiinflamatórios .....	164
5.2.6	Alzheimer e diabetes .....	165
5.2.7	Fatores genéticos .....	166
5.3	Diagnóstico .....	167
5.4	Tratamentos atuais .....	169
5.5	Objetivos específicos .....	170
5.6	Resultados e discussão .....	170
5.6.1	Acetilcolinesterase e butirilcolinesterase .....	170
5.6.2	Determinação da capacidade antioxidante através do método ORAC ( <i>Oxygen radical absorbance capacity</i> ) .....	173
5.6.3	Predição da permeação da barreira hematoencefálica através do ensaio de permeabilidade de membrana artificial paralela (PAMPA) .....	177
5.6.4	Determinação da produção de nitritos em culturas de células RAW 264.7	181

5.6.5	Ensaio com a proteína GSK-3 $\beta$ .....	183
5.7	Conclusão.....	195
5.8	Parte Experimental.....	197
5.8.1	Inibição de acetilcolinesterase e butirilcolinesterase .....	197
5.8.2	Ensaio da determinação da capacidade antioxidante .....	197
5.8.3	Determinação do potencial antiinflamatório.....	198
5.8.4	Inibição da proteína GSK-3 $\beta$ .....	198
5.8.5	Predição da permeação da barreira hematoencefálica. ....	199
5.8.6	Protocolo de docking.....	200
5.9	Referências.....	201
6	Considerações Finais .....	209
7	Anexo.....	211

Introdução



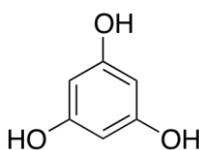
## 1 Introdução Geral

Extratos vegetais contendo metabólitos secundários são usados desde a antiguidade como medicamentos, poções mágicas e venenos (Moustapha & Pereira-Miranda, 2007). Metabólitos secundários são compostos que não estão envolvidos diretamente com as funções básicas de manutenção do vegetal, mas são de suma importância, pois atuam como inibidores de herbívoros, atrativos de polinizadores, antioxidantes, antivirais e antifúngicos, mantendo assim a planta mais resistente no seu *habitat*. Dentro deste vasto grupo de metabólitos secundários podem-se destacar os alcalóides, os terpenóides e os fenólicos. Os alcalóides são conhecidos pelo amargor e pela toxicidade que produzem nas plantas, duas características que mantêm insetos e predadores afastados, prolongando assim a sobrevivência destes vegetais. Exemplos deste grupo, usados na terapêutica, são a emetina como amebicida e emético; a atropina, a hiosciamina e a escopolamina como anticolinérgicos; a quinina como antimalárico; a camptotecina, a vimblastina e a vincristina como antitumorais; a codeína e a noscapina como antitussígenos; a morfina como hipoanalgésico, e a galantamina para o tratamento do Mal de Alzheimer (Moustapha & Pereira-Miranda, 2007). Já os terpenóides são responsáveis pela atração de animais polinizadores e pela repulsão de insetos, através de seus óleos voláteis. Como exemplos de terpenos usados na terapêutica podemos citar o  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A, utilizada em casos de xerofthalmia e a artemisinina como antimalárico (Simões *et.al.*, 2007). Os fenólicos constituem o terceiro grupo mais relevante de metabólitos secundários. Estes são ótimos antioxidantes e atuam nos vegetais como protetores de membranas celulares e tecidos que contém lipídeos. Além disso, antocianinas e flavonóides constituem boa parte dos pigmentos de flores, facilitando assim a sua visualização por insetos polinizadores (Simões *et.al.*, 2007).

Atualmente, este último grupo tem sido interesse de muitas pesquisas, visto que as propriedades antioxidantes dos seus compostos podem ser fundamentais para a cura de doenças como arteriosclerose, acidente vascular

cerebral, trombose cerebral, diabetes, doença de Alzheimer e Parkinson e câncer (Tiwari, 2004).

Neste trabalho, os fenólicos de interesse são derivados do floroglucinol 1 (Figura 1), metabólitos secundários encontrados em diversas famílias, como *Myrtaceae*, *Guttiferae*, *Euphorbiaceae*, *Aspidiaceae*, *Compositae*, *Rutaceae*, *Rosaceae*, *Clusiaceae*, *Laureaceae*, *Crassulaceae*, *Cannabinaceae* e *Fagaceae* (Singh e Bharate, 2006). Além de serem também encontrados no meio marinho e microbiano (Kong *et.al.*, 2009; Shanahan *et. al.*, 1993).

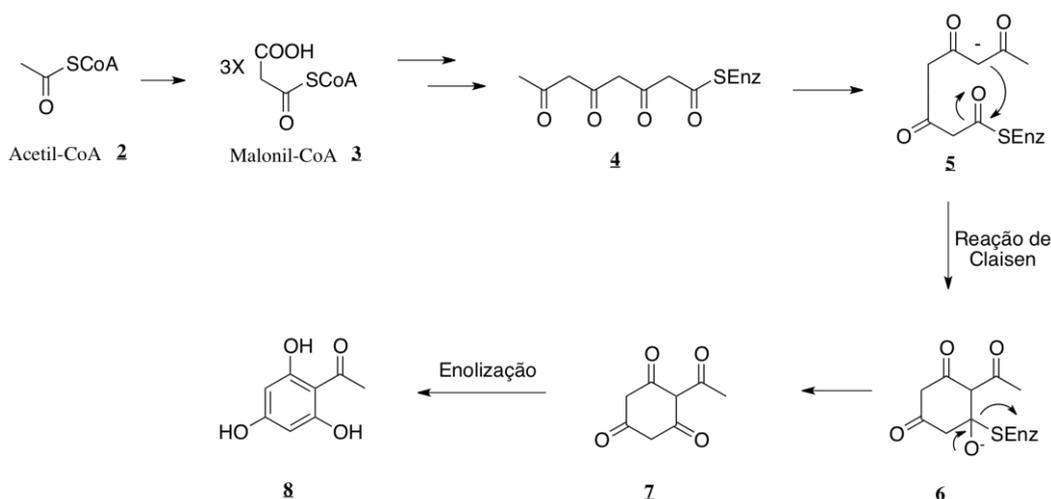


Floroglucinol 1

Figura 1: Estrutura do Floroglucinol 1.

### 1.1 Biossíntese dos derivados do floroglucinol

A rota biossintética de derivados do floroglucinol 1 deriva do ciclo do acetato (Waterman e Mole, 1994) conforme Esquema 1 (Dewick, 2001). O produto de partida acetil-CoA 2 polimeriza para formar uma cadeia de átomos com grupamentos carbonilas alternados. Para ocorrer esta polimerização, a acetil-CoA 2 é convertida na malonil-CoA 3, uma forma mais ativa, através da adição de CO<sub>2</sub>. O esquema abaixo apresenta a rota biossintética da floroacetofenona 8, no qual a cadeia com grupamentos cetona 5 cicliza via reação de *Claisen*, eliminando o grupamento tiol, resultando na formação do composto cicloexatriona 7 (Dewick, 2001). Este intermediário é transformado em uma forma aromática mais estável, levando ao composto final, floroacetofenona 8, que possui alternância entre átomos de carbono e de oxigênio, indicando que o metabolismo é acetato derivado.



Esquema 1: Biossíntese da floroacetofenona 8 (adaptado de Dewick, 2001).

## 1.2 Derivados do floroglucinol em diferentes espécies de *Hypericum*

A utilização de plantas para o tratamento de enfermidades é tão antiga quanto a humanidade. Isto possibilitou que pesquisas fossem desenvolvidas, com base no uso popular de determinadas plantas, em busca de extratos e de compostos isolados com as mais diversas atividades biológicas. Muitas espécies do gênero *Hypericum* são utilizadas desde a antiga Grécia, onde já eram conhecidas algumas de suas propriedades curativas. O farmacologista e botânico grego Dioscorides recomendava quatro espécies (*H. upericon*, *H. askuron*, *H. androsaimon* e *H. koris*) para nervo ciático e queimaduras. Além disso, afirmava que *H. Crispum* e *H. Barbatum* possuíam propriedades diurética e antimalárica, e incluiu o *H. perforatum* no conhecido livro “De materia medica”, onde estavam registradas plantas de uso terapêutico da época (Guedes *et.al.*, 2012). Para os gregos esta planta era usada como antiviral, antibacteriana, antitumoral, antiinflamatória, curava úlceras, feridas na pele e doenças respiratórias (Hussain *et.al.*, 2009). Já em 1525, Paracelso descobriu seu uso para distúrbios psiquiátricos como nevralgia, ansiedade, neurose e depressão (Hussain *et.al.*, 2009).

Na literatura científica, encontram-se artigos que tratam do isolamento de derivados do floroglucinol a partir de diferentes espécies de *Hypericum* e a

maioria destes compostos apresenta alguma atividade biológica, como por exemplo, antibacteriana, antitumoral, antioxidante e antidepressiva.

Jayasuriya e colaboradores (Jayasuriya *et.al.*, 1989 e 1991) isolaram nove compostos do extrato hexânico das folhas de *Hypericum drummondii* (Figura 2). Os compostos drumondinas A-F (9-14), isodrumondina D 15 e albaspidinas A-A 16 e P-P 17 foram ensaiados frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium smegmatis*, e os que apresentaram melhores resultados foram a drumondina E com CIM de 0,39 µg/mL frente *S. aureus*, a isodrumondina D 15 e a drumondina E 13 com CIM de 0,20 µg/mL frente *B. subtilis*. Os compostos drumondina A-C (9-11), drumondina F 14 e albaspidina A-A 16 e P-P 17 também foram ensaiados frente a diferentes linhagens celulares (P-388, KB, mama, intestino, pulmão e melanoma) a fim de avaliar a potencial citotoxicidade. Todos, com exceção das albaspidinas, apresentaram citotoxicidade frente às linhagens testadas, sendo as drumondinas A-C (9-11) os compostos mais ativos, porém pouco seletivos.

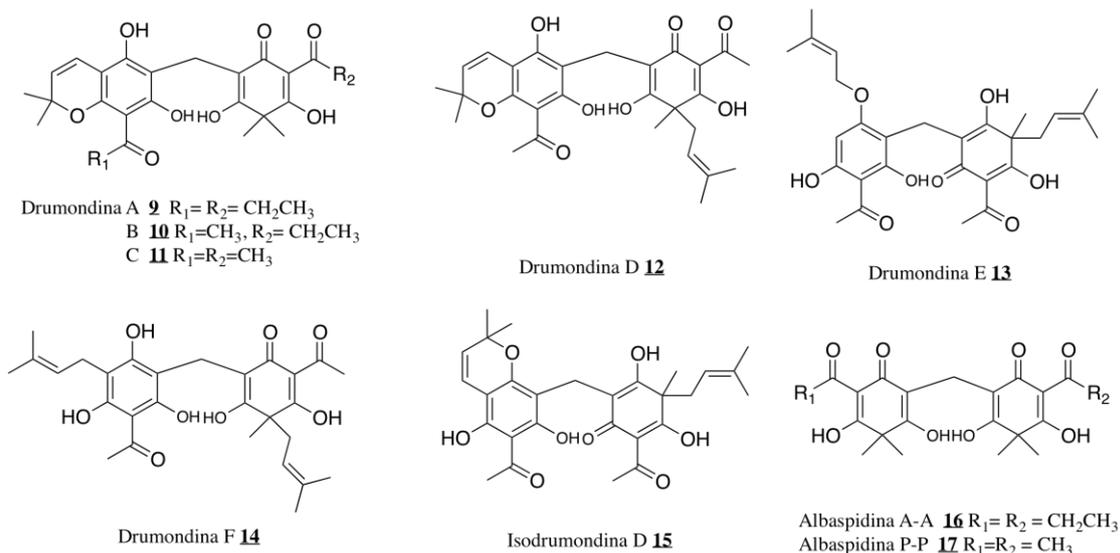


Figura 2: Estruturas dos compostos drumondina A-F (9-14), isodrumondina D 15 e albaspidina A-A 16 e P-P 17, isolados de *Hypericum drummondii*.

Ishiguro e colaboradores (Ishiguro *et.al.*, 1994) isolaram do *Hypericum japonicum*, através de fracionamento bioquímico de extratos metanólicos e etéreos

de toda planta, dois derivados do floroglucinol, o sarotraleno C 18 e o sarotraleno D 19 (Figura 3), que possuem atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* com CIM de 25 µg/mL e 12,5 µg/mL, respectivamente.

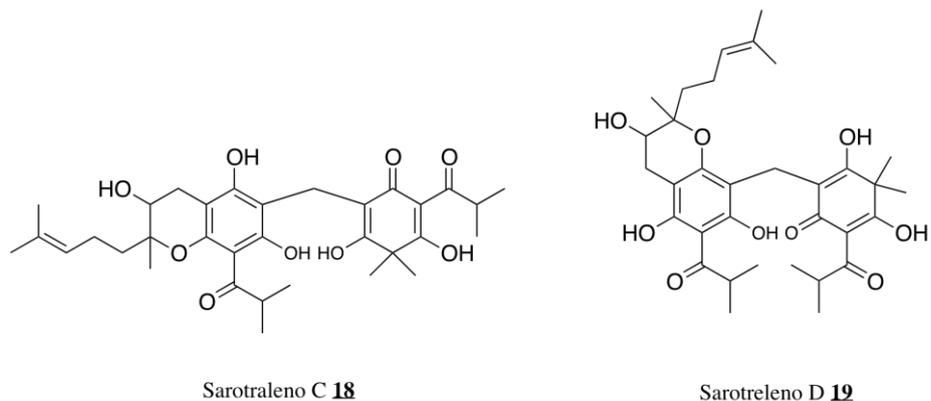


Figura 3: Estruturas dos compostos sarotraleno C 18 e sarotraleno D 19, isolados de *Hypericum japonicum*.

Hu e colaboradores (Hu *et.al.*, 2000) isolaram das partes aéreas do *Hypericum japonicum* um novo derivado de floroglucinol 21, juntamente com outros dois derivados já descritos na literatura, flavesona 20 e sarotraleno B 22 (Figura 4).

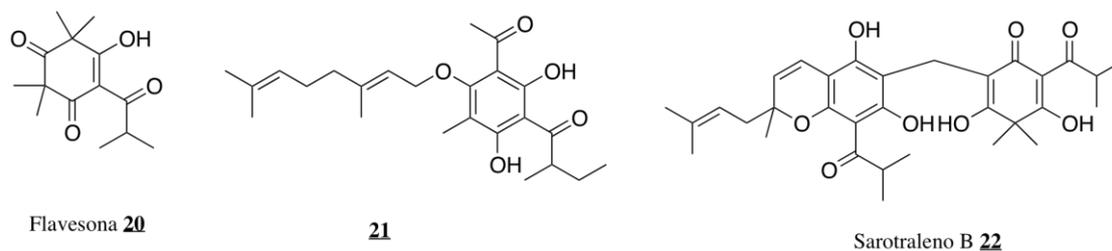


Figura 4: Estruturas dos compostos flavesona 20, composto 21 e sarotraleno B 22, isolados de *Hypericum japonicum*.

Winkelmann e colaboradores (Winkelmann *et.al.*, 2001a), através do fracionamento bioguiado, isolaram do extrato éter de petróleo de *Hypericum papuanum*, 5 compostos tricíclicos derivados de acilfloroglucinol, as papuaforinas A-E (23-27), e 3 bicíclicos, isolados com seus tautômeros, as hiperguinonas A 28, Aa 29, B 30 e Ba 31 e a hiperpapuanona 32 e o seu tautômero 33 (Figura 5). Os compostos foram ensaiados frente a linhagem

celular KB (carcinoma nasofaríngeal humano), na qual os melhores resultados foram apresentados pelos compostos papuaforinas A 23, C 25, D 26 e E 27, hiperguinona B 29 e hiperpapuanona 30, com  $Ic_{50}$  de 7,5  $\mu\text{g/mL}$ , 4,9  $\mu\text{g/mL}$ , 6,6  $\mu\text{g/mL}$ , 5,6  $\mu\text{g/mL}$ , 13  $\mu\text{g/mL}$ , e 3,2  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. E nos ensaios frente aos microorganismos *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus*, os compostos apresentaram valores pouco significativos quando comparados ao controle positivo cloranfenicol.

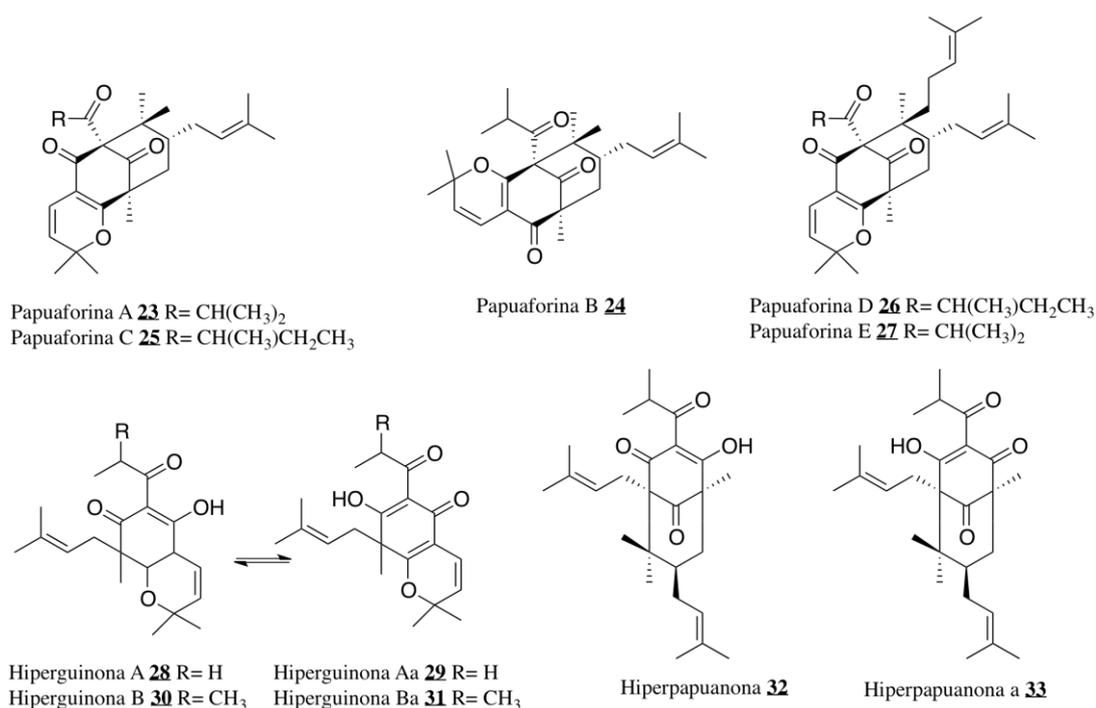


Figura 5: Estruturas dos compostos papuaforinas A-E (23-27), hiperguinonas A 28 e B 30 e seus tautômeros 29 e 31 e a hiperpapuanona 32 e seu tautômero 33, isolados do *Hypericum papuanum*.

Em outros trabalhos do mesmo grupo, (Winkelmann *et.al.* 2000 e 2001b) nos quais foi realizada outra extração bioguiada a partir do extrato éter de petróleo das partes aéreas do *Hypericum papuanum*, foram isolaram 13 derivados do floriglucinol, as ialibinonas A-E (34-43), as papuaforinas A-E (23-27), as hiperguinonas A (28-29) e B (30-31) e a hiperpapuanona (32-33), todos na sua forma tautomérica, sendo sete inéditos, três derivados prenilados e quatro derivados bicíclicos acilfloriglucinol (Figura 6). Os compostos foram

identificados e ensaiados quanto à sua atividade antibacteriana, na qual as ialibinonas C (38-39) e D (40-41) apresentaram uma CIM de 16 µg/mL frente a *Bacillus cereus* e *Staphylococcus epidermidis*.

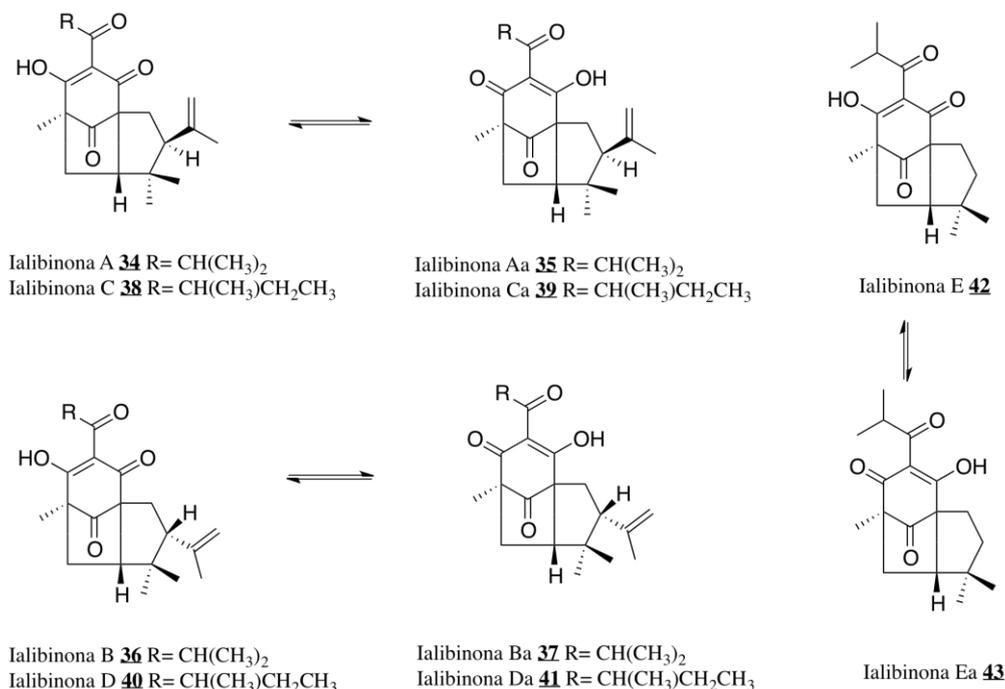


Figura 6: Estruturas dos compostos ialibinonas A-E e seus tautômeros (34-43), isolados de *Hypericum papuanum*.

An e colaboradores (An *et.al.*, 2002a) isolaram do *Hypericum erectum* três novos compostos isoprenilados derivados do floroglucinol, as erectquionas A-C (44-46). Anos mais tarde, Moon e colaboradores (Moon, 2010) também isolaram do extrato clorofórmio de *Hypericum erectum* cinco derivados do floroglucinol, a otogirina 47, a otogirona 48 e as erectquionas A-C (44-46) (Figura 7). Os compostos foram avaliados quanto à sua citotoxicidade em linhagem de célula de câncer SK-OV-3 e não apresentaram citotoxicidade significativa. Também foram avaliados frente a cepa de *Plasmodium falciparum* cloroquina resistente, na qual os compostos otogirina 48 e erectquiona B 45 apresentaram IC<sub>50</sub> de 5,6 µM e 7,2 µM, respectivamente. Tada e colaboradores (Tada, *et. al.*, 1991) também isolaram o composto otogirina 47 a partir do extrato metanólico das raízes de *Hypericum erectum* e o composto otogirona 48 a partir do extrato das flores desta

mesma planta. Ambos os compostos foram ensaiados para atividades anti-tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) e anti-leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>). A uma concentração de 2 x10<sup>-5</sup> M apresentaram uma inibição de 10,8 e 94,9% frente a TXA<sub>2</sub> e de 12,6 e 63,6% frente a LTD<sub>4</sub>, respectivamente.

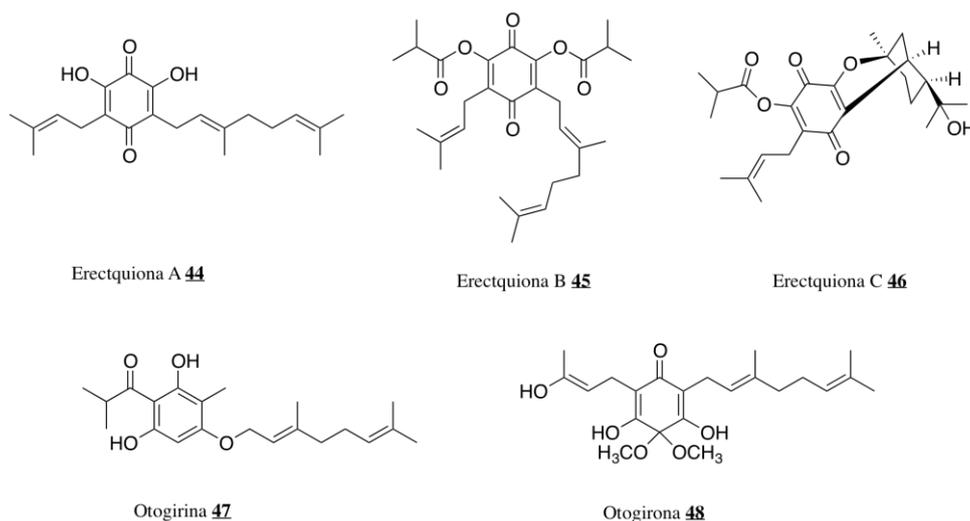
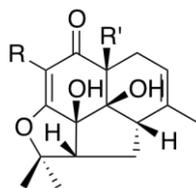


Figura 7: Estruturas dos compostos erectquiona A-C (44-46), otogirina 47 e otogirina 48, isolados do *Hypericum erectum*.

An e colaboradores (An *et.al.*, 2002b) isolaram dois novos derivados prenilados, as erectonas A 49 e B 50, a partir do extrato éter de petróleo do *Hypericum erectum* (Figura 8). Esses dois compostos foram ensaiados frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, porém nenhum dos dois apresentou atividade significativa frente a quaisquer destes microorganismos.



Erectona A 49 R= CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
R'=CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
Erectona B 50 R= CH<sub>2</sub>C(HCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
R'=CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Figura 8: Estruturas dos compostos erectonas A 49 e B 50, isolados do *Hypericum erectum*.

Sävikin-Fodulovic e colaboradores (Sävikin-Fodulovic *et.al.*, 2003) isolaram o composto hiperatomarina a-b na forma de tautômero (51-52) do *Hypericum atomarium* SSP. *Degenii* (Figura 9). O composto apresentou atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Micrococcus luteus* com CIM de 1,56 µg/mL.

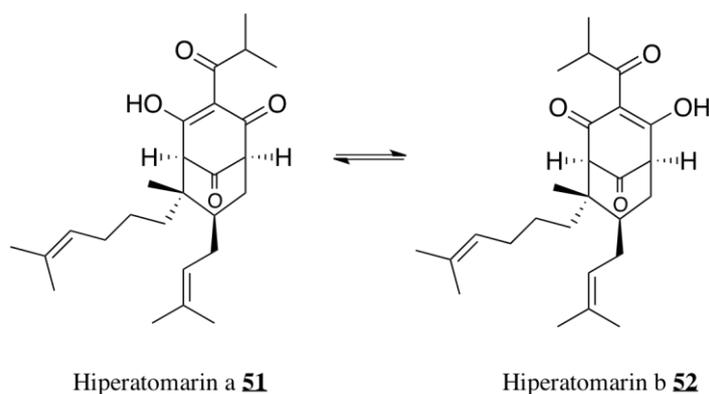


Figura 9: Estruturas dos tautômeros hiperatomarina a-b (51-52) isolados do *Hypericum atomarium*.

Athanasas e colaboradores (Athanasas *et. al.*, 2004) isolaram do extrato diclorometano, das partes aéreas de *Hypericum jovis*, dois novos derivados de floroglucinol, o hiperjovinol A 53 e o hiperjovinol B 54, além de outros 4 compostos já descritos na literatura (Figura 10). Os compostos isolados foram ensaiados com o objetivo de analisar sua potencial atividade preventiva na produção de substâncias reativas de oxigênio em células de fibroblastos humanos. Os compostos 53 e 55 apresentaram uma atividade de  $49,2 \pm 4,1\%$  e  $50,8 \pm 4,5\%$ , respectivamente a uma concentração de 100 µM, comparável ao controle positivo trolox, que apresentou  $55,2 \pm 6,0\%$ .

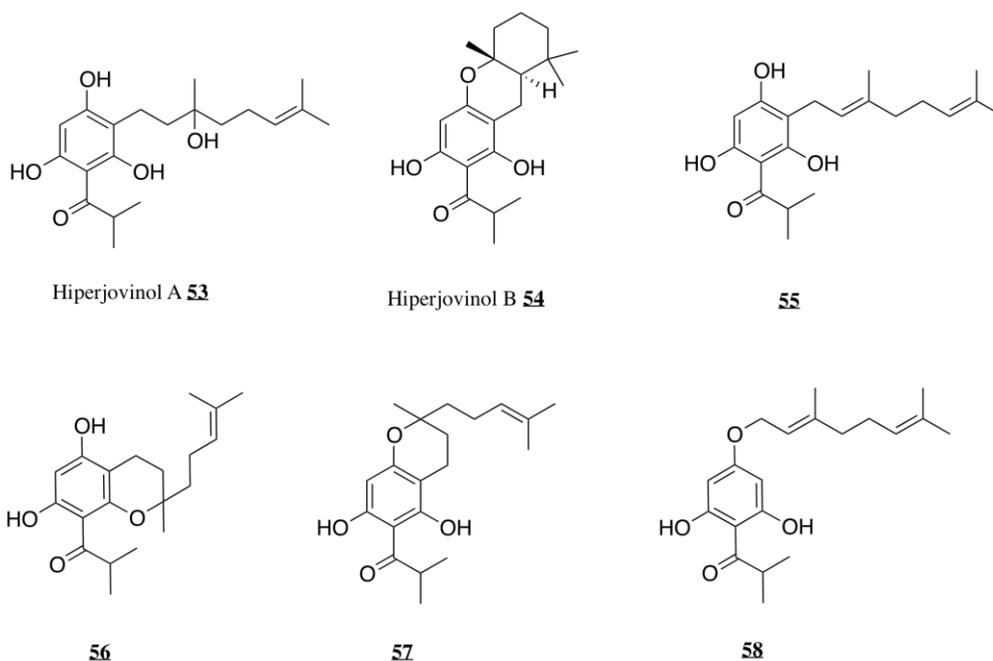


Figura 10: Estruturas dos compostos hiperjovinol A **53** e B **54** e dos compostos **55-58**, isolados do *Hypericum jovis*.

No trabalho de Nör e colaboradores (Nör *et.al.*, 2004) foram estudadas quatro espécies de *Hypericum* existentes apenas no sul do Brasil, *H. caprifoliatum* Cham. & Schldl. e *H. connatum* Lam., dos quais isolaram o composto hiperbrasilol B **59** (figura 11), já descrito por Rocha (Rocha *et.al.*, 1996), isolado do *H. brasiliense*. Dos *H. carinatum* Griseb. e *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt., Nör e colaboradores (Nör *et.al.*, 2004) isolaram o composto uliginosina B **60** (Figura 11), já descrito por Ferraz (Ferraz *et.al.*, 2002), isolado do *H. myrianthum*. Fritz e colaboradores (Fritz *et. al.*, 2007) também isolaram o hiperbrasilol B **59** a partir do extrato n-hexânico das partes aéreas de *Hypericum connatum*, que apresentou uma redução na faixa de 0,5-0,9 log<sub>10</sub> da infecção frente à cepa viral de herpes HSV, sendo considerada uma atividade moderada para a atividade antiviral,.

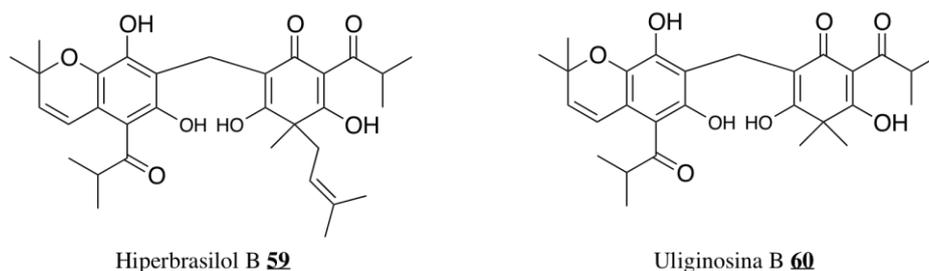


Figura 11: Estruturas dos compostos hiperbrasilol B **59**, isolado do *Hypericum caprifoliatum* e uliginosina B **60**, isolado do *H. carinatum* e *H. polyanthemum*.

Dall’Agnol e colaboradores (Dall’Agnol *et. al.*, 2005) estudaram os extratos hexano, clorofórmio e metanol de diferentes espécies de *Hypericum*, como *Hypericum myrianthum* Cham. & Schlecht, *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt e *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlecht. Os extratos hexânicos contendo grande quantidade de fenólicos apresentaram atividade frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P). Desta forma, foram isolados e identificados 5 compostos, três de *Hypericum polyanthemum* (HP1 **61**, HP2 **62**, HP3 **63**), e dois de *Hypericum myrianthum* (uliginosina B **60** e japonicina A **64**) (Figura 12). Os compostos isolados foram ensaiados novamente frente à cepa ATCC6538P de *S. aureus*, e com exceção de HP1 **61**, todos apresentaram atividade inibitória de crescimento de *S. aureus*. Em outro trabalho (Haas *et.al.*, 2010), foram testados HP1 **61**, HP2 **62** e HP3 **63** para efeito antinociceptivo através do teste da placa quente. Apenas o composto HP1 **61** apresentou atividade (30, 60, 90 mg/kg, i.p.) e o efeito mostrou-se dose dependente.

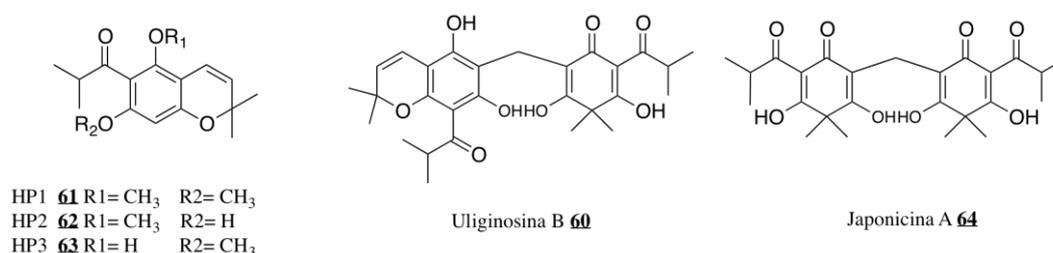


Figura 12: Estruturas dos compostos HP1 **61**, HP2 **62**, HP3 **63**, uliginosina B **60** e japonicina A **64**, isolados do *H. polyanthemum* e *H. myrianthum*.

Hashida e colaboradores (Hashida *et.al.*, 2008) isolaram das folhas do *Hypericum ascyron* oito novos derivados acilfloroglucinóis, denominados tameonas A-H (65-72) (Figura 13), todos contendo em sua estrutura grupamentos isoprenilos geminais e uma porção monoterpênica. Os compostos foram avaliados frente a sete linhagens celulares de câncer, nas quais a tameona F (70) apresentou citotoxicidade em células KB com IC<sub>50</sub> de 6,2 µM, em células KB-C2 com IC<sub>50</sub> de 31,5 µM e em células K562/Adr com IC<sub>50</sub> de 17,1 µM, sendo os dois últimos valores, melhores que o controle doxorrubicina.

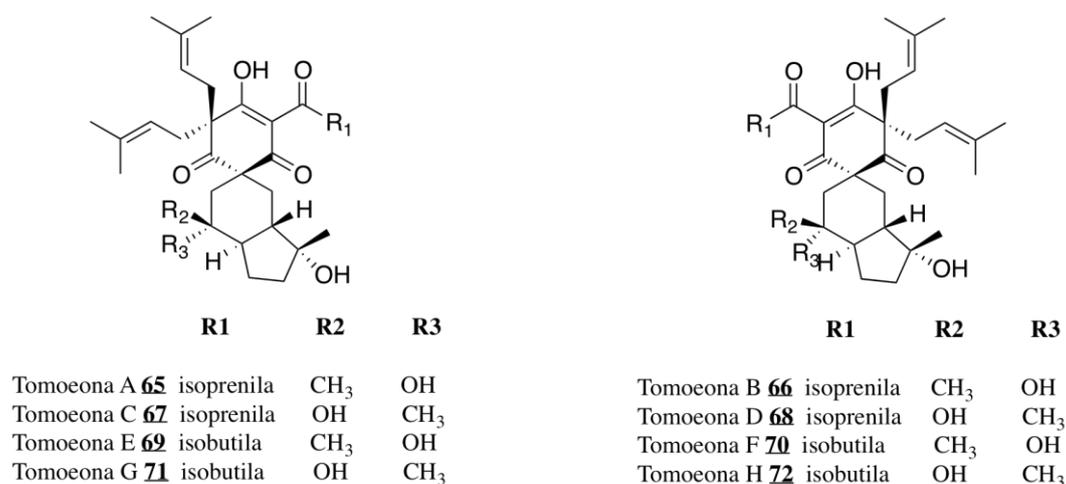


Figura 13: Estruturas dos compostos tameonas A-H (65-72), isolados do *Hypericum ascyron*.

Tanaka e colaboradores (Tanaka *et.al.*, 2008, 2009a, 2009b e 2010) isolaram das partes aéreas do *Hypericum pseudopetiolatum* treze novos derivados do floroglucinol (Figura 14), as petiolinas A (73-74) e B (75-76) na forma de tautômeros, e as petiolinas C-M (77-87). Os derivados A-C (73-77) e J-M (84-87) foram ensaiados frente a células L1210 (linfoma murina) apresentando IC<sub>50</sub> >10 µg/mL, com exceção das petiolinas A (73-74) e C 77 que apresentaram IC<sub>50</sub> de 2,5 µg/mL e 3,3 µg/mL, respectivamente. Frente a células KB (carcinoma epidermóide) as petiolinas A-C (73-77) apresentaram IC<sub>50</sub> de 4,8 µg/mL, 9,6 µg/mL e 4,9 µg/mL, respectivamente e as demais IC<sub>50</sub> >10 µg/mL. Também foram ensaiados frente a *Trichophyton mentagrophytes*, na qual as petiolinas C 77 e J 84 apresentaram CIM de 33,3 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Dos

compostos testados frente a *Micrococcus luteus* e *Cryptococcus neoformans* [J-M (84-87)], apenas a petiolina J **84** apresentou atividade com CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$  e 16  $\mu\text{g/mL}$ .

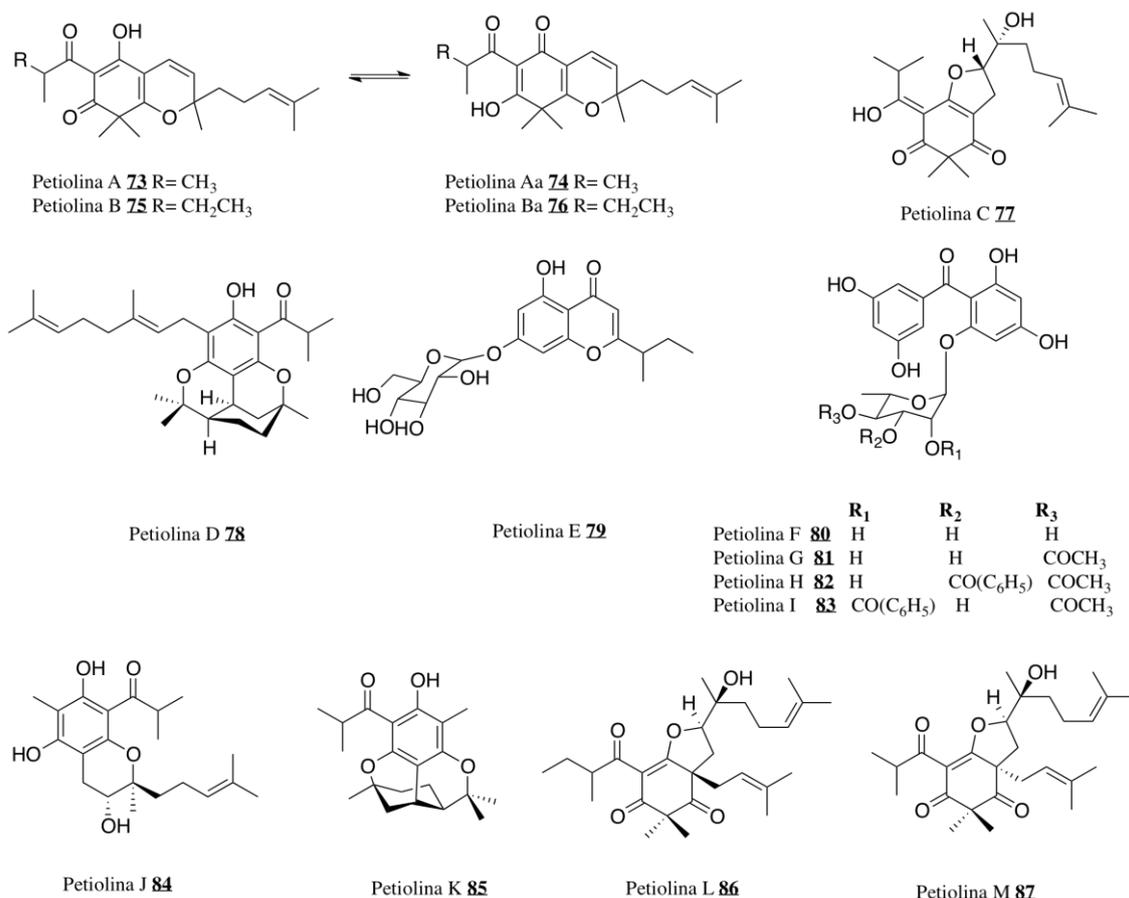


Figura 14: Estruturas dos compostos petiolinas A (**73-74**) e B (**75-76**) na forma de tautômeros e petiolinas C-M (**77- 87**), isolados do *Hypericum pseudopetiolum*.

No trabalho de Schmidt e colaboradores (Schmidt *et. al.*, 2012) foram isolados do extrato éter de petróleo de *Hypericum empetrifolium* cinco derivados acilfloroglucinóis substituídos com monoterpenos (empetrifelixinas A-D (**88-91**) e empetrikajaforina **92**) e quatro acilfloroglucinóis monocíclicos **93**, **94**, **95** e **96** (Figura 15). Os compostos foram ensaiados para a atividade antiangiogênica e a inibição de proliferação celular foi medida em linhagem celular HMEC-1, na qual os compostos empetrifelixina A **88** e D **91** apresentaram os melhores resultados com valores de IC<sub>50</sub> de 6,5 e 7,3  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Crockett e

colaboradores (Crockett *et. al.*, 2008) também isolaram os compostos **94** e **95** desta mesma planta e testaram para atividade antiinflamatória *in vitro*. O composto **94** apresentou boa atividade contra COX-1, COX-2 e 5-LOX catalisando a formação de LTB<sub>4</sub>, com valores de IC<sub>50</sub> de 6,0, 29,9 e 2,2 μM, respectivamente. Já o composto **95** apresentou atividades moderadas contra formação de LTB<sub>4</sub> com IC<sub>50</sub> de 5,8 μM e contra COX-1, com IC<sub>50</sub> de 26,2 μM.

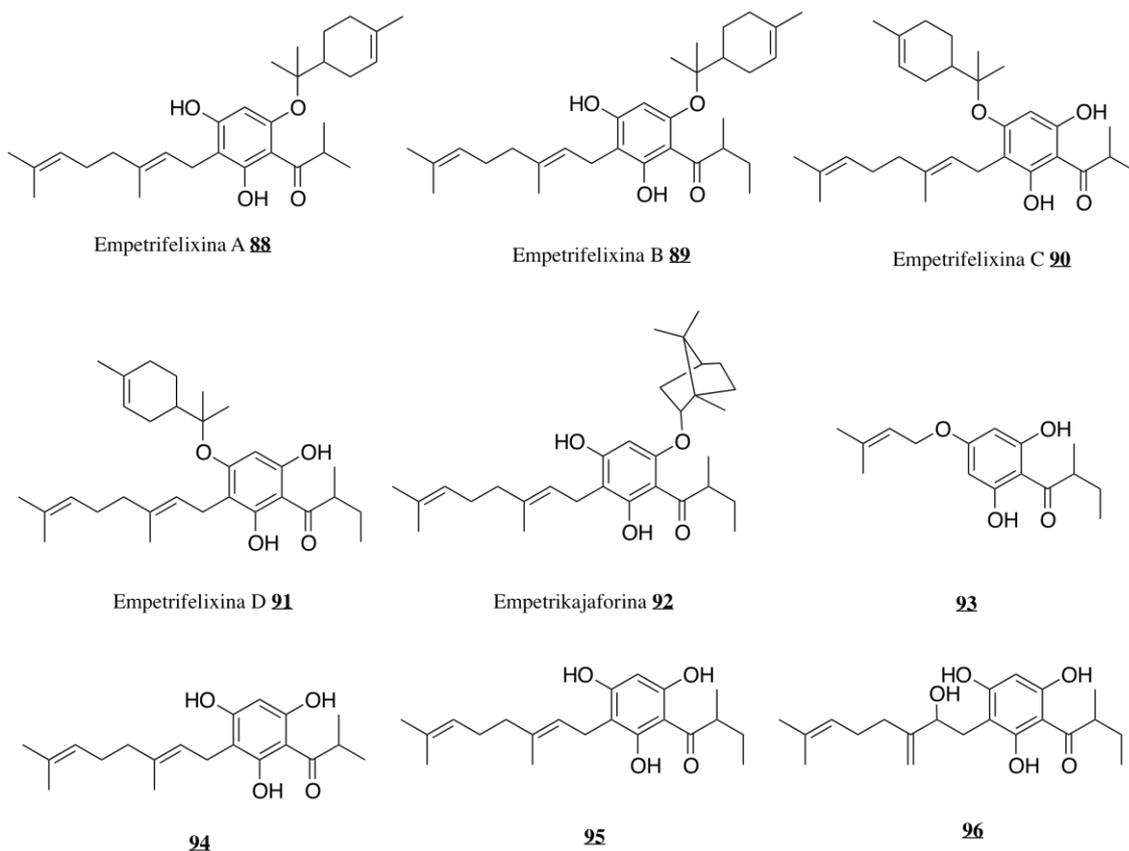


Figura 15: Estruturas dos compostos empetrifelixina A-D (**88-91**), empetrikajaforina **92** e os monocíclicos **93-96**, isolados do *Hypericum empetrifolium*.

### 1.2.1 *Hypericum* e atividade antidepressiva

Além das atividades já descritas, alguns extratos e compostos isolados de espécies de *Hypericum*, apresentam atividade antidepressiva. O exemplar mais conhecido deste gênero é o *Hypericum perforatum*, uma planta muito utilizada na medicina popular, comumente encontrada na Ásia, Estados Unidos e Europa. Também conhecida como erva-de-são-joão, tem sido utilizada em preparações

farmacêuticas para o tratamento de depressão suave a moderadamente grave, na Europa, América do Sul e Estados Unidos. A atividade antidepressiva desta planta deve-se à presença de naftodianonas (hipericina 97) (Figura 16), flavonóides (hiperosídeos 98) e principalmente do derivado acilfloroglucinol chamado hiperforina 99 (Figura 16), como foi constatado em estudos pré-clínicos e clínicos (Chatterjee *et.al.*, 1998a; 1998b; Muller *et.al.*, 2003; Zanolli *et.al.*, 2004). O mecanismo de ação da hiperforina ainda não é conhecido, mas sabe-se que este composto é um potente inibidor de recaptação de serotonina, dopamina, noradrenalina, GABA e *L*-glutamato em preparações de estriados de ratos (Hussain *et.al.*, 2009).

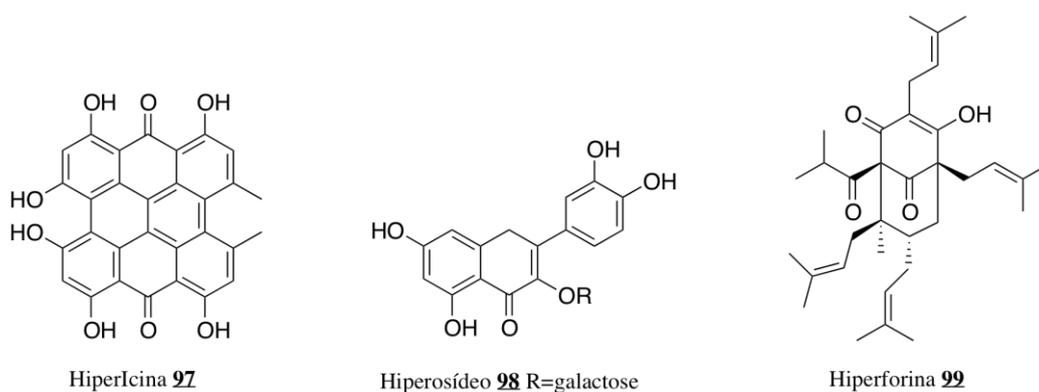
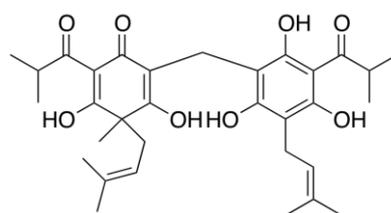


Figura 16: Estruturas dos compostos hipericina 97, hiperosídeo 98 e hiperforina 99, presentes no *Hypericum perforatum*.

O uso de espécies brasileiras de *Hypericum* pela população como antidepressivo não é documentado e estima-se a ocorrência de cerca de 20 espécies brasileiras de *Hypericum* (von Poser *et.al.*, 2006). A partir das folhas e flores de *H. brasiliense* Choisy foram isoladas xantonas e derivados de floroglucinol. Extratos contendo essas substâncias inibiram a enzima monoaminoxidase (MAO) na concentração de  $1,5 \times 10^{-2}$  mg/mL (Rocha *et.al.*, 1994; 1995; 1996), mas não foram ativos no teste de natação forçada (TNF) em ratos (Mendes *et.al.*, 2002).

Dentre os compostos que apresentaram melhores resultados para a atividade antidepressiva destaca-se o composto HC-1 100, isolado do *Hypericum caprifoliatum*, e que não tem sua estrutura totalmente elucidada,

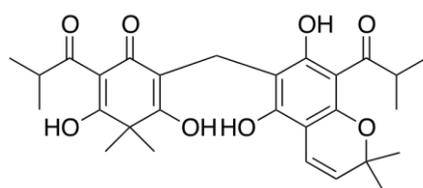
mas os pesquisadores propõe uma mistura tautomérica do derivado de floroglucinol (Figura 17). Uma fração enriquecida com este composto foi analisada na recaptação neuronal de aminas biogênicas em corpo estriado (para dopamina), em córtex frontal (para 5HT) e hipotálamo (para noradrenalina) de ratos, apresentando maior potência para dopamina, de modo dose-dependente (Viana *et.al.*, 2005).



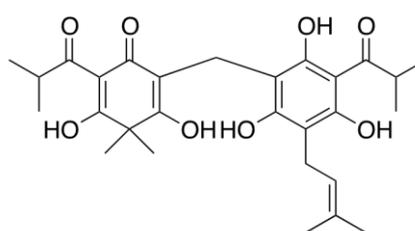
HC-1 **100**

Figura 17: Estrutura proposta para o composto HC-1 **100**.

Outro dímero derivado do floroglucinol formado por uma unidade de floroglucinol e uma unidade de ácido filicínico, a uliginosina B **60** (figura 18), foi extraída das espécies nativas do Rio Grande do Sul, *H. myrianthum* e *H. carinatum* (Ferraz *et.al.*, 2002; Bernardi *et.al.*, 2008). Este composto é um dos responsáveis pela atividade antidepressiva de *H. polyanthemum* (Rates *et.al.*, 2010). Este mesmo composto também foi isolado de *H. uliginosum* (Taylor *et.al.*, 1969) juntamente com a uliginosina A **100** (Figura 18) (Rocha *et.al.*, 1995; Abreu *et.al.*, 2004a, 2004b).



Uliginosina B **60**



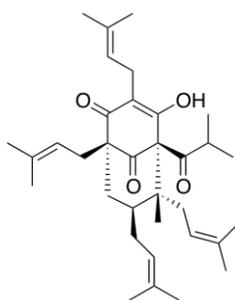
Uliginosina A **101**

Figura 18: Estruturas das uliginosinas A **101** e B **60**, extraídas do gênero *Hypericum*.

### 1.2.2 Derivados de floroglucinol e a Doença de Alzheimer

A atividade neuroprotetora para a doença de Alzheimer também é descrita na literatura para alguns desses derivados, como a hiperforina 99 e seu derivado 102 (Dinamarca *et.al.*, 2006 e 2008; Cerpa *et.al.*, 2010; Griffith *et.al.*, 2010; Lin *et.al.*, 2006). O artigo mais recente (Cerpa *et.al.*, 2010) trata do efeito *in vivo* do derivado da hiperforina 102 (IDN5706, tetra-hidro-hiperforina) (

Figura 19) na neuropatologia cerebral, no aprendizado e no declínio da memória no modelo animal duplo transgênico para a doença de Alzheimer (APP<sup>swe</sup>, PS-1 dE9).



IDN 5706 102

Figura 19: Estrutura do derivado da hiperforina, IDN 5706 102.

Para avaliar o potencial efeito neuroprotetor da tetra-hidro-hiperforina frente à neurotoxicidade A $\beta$  *in vivo*, camundongos machos transgênicos (com altos e significantes níveis de A $\beta$ ) foram injetados i.p. com 2 mg/kg/dia de IDN5706 102 por um período de quatro semanas. Como resultados, encontraram que o derivado semi-sintético não afeta os níveis totais de A $\beta$ . Porém, altera o tamanho dos depósitos amilóides e revertem o dano na memória, o estresse oxidativo e a astrogliose (Cerpa *et.al.*, 2010).

### 1.3 A Depressão e a Doença de Alzheimer

O estudo de novos compostos ativos é importante, já que atualmente parte da população mundial sofre com algum transtorno ou doença de origem neurológica. Dentre as doenças que mais atingem a população, podemos destacar a depressão, que atinge cerca de 21% da população e alguns tipos de demência, como a doença de Alzheimer, que afeta 10% dos indivíduos com idade superior a 65 anos e 50%, dos que possuem idade superior a 85 anos (Chopra, 2011).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a depressão atinge 121 milhões de pessoas no mundo e está entre as principais causas que contribuem para incapacitar um indivíduo (OMS, 2008; Tamminga *et.al.*, 2002). Cerca de 95 milhões de pessoas que vivem em países em desenvolvimento e que apresentam a doença, não estão recebendo tratamento adequado (OMS, 2008). A OMS projeta que até o ano de 2020, a depressão estará em segundo lugar no *ranking* das 107 doenças que causam perda da qualidade de vida (OMS, 2008). A depressão ocorre em todas as idades e em ambos os sexos, porém estudos recentes têm demonstrado uma maior incidência em mulheres, idosos e pessoas de alto poder aquisitivo (Dobos *et.al.*, 2010; Chopra, 2011). O uso de medicamentos antidepressivos é essencial para o tratamento desta doença e é mais eficaz quando associado à psicoterapia.

Já a Doença de Alzheimer e outros tipos de demência atingem mais de 24 milhões de pessoas, sendo que este número pode dobrar a cada 20 anos, devido ao envelhecimento da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento. A demência em geral é progressiva e afeta principalmente a memória recente, a orientação, a compreensão e as capacidades de aprendizado, de linguagem e de julgamento (Chopra, 2011).

Muitos estudos que estão sendo desenvolvidos na Inglaterra, na Holanda e nos Estados Unidos têm demonstrado que a possibilidade de existir uma relação entre depressão e demência seja grande (Saczynski *et.al.*, 2010; Lyketsos, 2010). A inflamação do tecido cerebral e o aumento de certas proteínas no cérebro

durante o quadro de depressão poderiam aumentar as chances de o paciente desenvolver demência (Saczynski *et.al.*, 2010; Dobos *et.al.*, 2010). Na Holanda, pesquisadores constataram que pessoas com histórico depressivo são 2,5 vezes mais suscetíveis a sofrerem de demência (Geerlings *et.al.*, 2008). Em outro estudo, constatou-se que aqueles pacientes que tiveram dois ou mais episódios de depressão apresentaram quase o dobro do risco de desenvolver demência (Wilson *et.al.*, 2008). Porém a presidente executiva do fundo de investigação de Alzheimer do Reino Unido, Rebecca Wood, afirma que “a similaridade entre os sintomas de demência e depressão pode significar que ambas se confundam no momento do diagnóstico, porém não se sabe se estão biologicamente vinculadas” (News Health, 2011). A discussão sobre os resultados obtidos nestes estudos é grande, mas é consenso entre os pesquisadores que estudos mais profundos e detalhados devem ser realizados a fim de esclarecer se existe de fato um vínculo estreito entre as duas doenças.

Com base nos dados apresentados, a respeito das potenciais atividades dos derivados do floroglucinol e da possível relação entre a ocorrência de demência em virtude de episódios depressivos no decorrer dos anos, acredita-se que estes compostos sejam ponto de partida para a descoberta de um protótipo capaz de curar a depressão e evitar assim a maior incidência do desenvolvimento de enfermidades neurodegenerativas como a doença de Alzheimer.

Para tanto, os derivados do floroglucinol sintetizados neste trabalho foram avaliados *in vivo* frente à atividade do tipo antidepressiva no teste de suspensão pela cauda, em colaboração com Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS, coordenado pela Prof. Dr. Stela M. K. Rates. Já os ensaios *in vitro* e a modelagem molecular, para avaliar o potencial terapêutico para a Doença de Alzheimer, foram realizados durante meu estágio no Instituto de Química Médica do Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), localizado em Madrid, Espanha, com a supervisão e orientação das Dr. Ana Martinez e Carmen Gil.



## 1.4 Referências

- Abreu, I., Porto, A., Marsaioli, A., Mazzafera, P. (2004a). Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. *Plant Science*, v.167, pp. 949-954.
- Abreu, I., Reis, M., Marsaioli, A., Mazzafera, P. (2004b). Essential oil composition of *Hypericum brasiliense* Choise. *Flavour and Fragrance Journal*, v.19, pp. 80-82.
- An, Tian-ying; Ming-De, Shan; Hu, Li-Hong; Liu, Shou-Jing; Chen, Zhong-Liang. (2002a). Polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum*. *Phytochemistry*, v.59, pp. 395-398.
- An, Tian-ying; Hu, Li-hong; Chen, Zhong-liang; Sim, Keng-Yeow. (2002b). Erectones A and B, two dome-shaped polyprenylated phoroglucinol derivatives, from *Hypericum erectum*. *Tetrahedron Letters*, v.43, pp. 163-165.
- Athanasas, K.; Magiatis, P.; Fokialakis, N.; Skaltsounis, Alexius-Leandros; Pratsinis, H.; Kletsas, D. (2004). Hyperjovinols A and B: two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum Jovis* with antioxidant activity in cell cultures. *Journal of Natural Products*, v.67, pp. 973-977.
- Bernardi, A.; López-Alarcon, C.; Aapee, A.; Rech, S.; von Poser, G.; Bridi, R., et al. (2008). Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, v.53, pp. 1126-1128.
- Cerpa, W.; Hancke, J.; Morazzoni, P.; Bombardelli, E.; Riva, A.; Marin, P., et al. (2010). The hyperforin derivative IDN5706 occludes spatial memory impairments and neuropathological changes in a double transgenic Alzheimer's mouse model. *Current Alzheimer Research*, v.7, pp. 126-133.
- Chatterjee, S.; Noldner, M.; Koch, E.; Erdelmeier, C. (1998a). Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin, the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*, v.31, pp. 7-15.
- Chatterjee, S.; Bhattacharya, S.; Wonnemann, M.; Singer, A.; Muller, W. (1998b). Hyperforin as a possible antidepressant component of *Hypericum* extracts. *Life Sciences*, v.63, pp. 449-510.
- Chopra, K. (2011). *Neurobiology of depression and Alzheimer's disease*. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG.

- Crockett, S.; Wenzig, E.; Kunert, O.; Bauer, R. (2008). Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochemistry Letters*, v.1, pp. 37-43.
- Dall'agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.; Albring, D.; Nor, C.; Schapoval, E., *et al.* (2005). Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. *Phytoterapy Research*, v.19, pp. 291-293.
- Dewick, P. (2001). *Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach*. Inglaterra: jonh Wiley and Sons Ltda.
- Dinamarca, M.; Cerpa, W.; Garrido, J.; Hancke, J.; Inestrosa, N. (2006). Hyperforin prevents  $\beta$ -amyloid neurotoxicity and spatial memory impairments by disaggregation of Alzheimer's amyloid- $\beta$ -deposits. *Molecular Psychiatry*, v.11, pp. 1032-1048.
- Dinamarca, M. A.; Hancke, J.; Inestrosa, N. (2008). Release of acetylcholinesterase (ACH) from beta-amyloid plaques assemblies improves the spatial memory impairments in APP-transgenic mice. *Chemico-Biological Interactions*, v.175, pp. 142-149.
- Dobos, N.; Prins, M.; De Vries, E. (2010). Indoleamine-2,3-dioxygenase: a Link between Neuroinflammation and Depression in Alzheimer's Disease. *European Journal Of Nuclear Medicine And Molecular Imaging*, v.37, pp. S259-S259.
- Ferraz, A.; Schripsema, J.; Pohlmann, A.; Von Poser, G. (2002). Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.30, pp. 989-991.
- Fritz, D.; Venturi, C.; Cargnin, S.; Schripsema, J.; Roehe, P.; Montanha, J., *et al.* (2007). Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 11, pp. 517–520.
- Geerlings, M. I.; Heijer, T. D.; Koudstaal, P. J.; Hofman, A.; Breteler, M. (2008). History of depression, depressive symptoms, and medial temporal lobe atrophy and the risk of Alzheimer disease. *Neurology*, v. 70, pp. 1258-1264.
- Griffith, T.V.N. (2010). Neurobiological Effects of Hyperforin and its Potential in Alzheimer's Disease Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, v.17, pp. 391-406.

- Guedes, A.; Franflin, G.; Fernandes-Ferreira, M. (2012). *Hypericum* sp.: essential oil composition and biological activities. *Phytochemistry Reviews*, v.11, pp. 127-152.
- Haas, J.; Viana, A.; Heckler, A.; Von Poser, G.; Rates, S. M. (2010). The antinociceptive Effect of a benzopyran (HP1) Isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice Hot-Plate test is blocked by naloxone. *Planta Medica*, v.76, pp. 1419-1423.
- Hashida, W.; Tanaka, N.; Kashiwada, Y.; Sekiya, M.; Ikeshiro, Y.; Takaishi, Y. (2008). Tomoeones A-H, cytotoxic phloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron*. *Phytochemistry*, v.69, pp. 2225-2230.
- Hu, L.H.; Khoo, C.W.; Vittal, J.; Sim, K.Y. (2000). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, v.53, pp. 705-709.
- Hussain, S.; Ansari, Z.; Arif, M. (2009). Hyperforin: A lead for Antidepressants. *International Journal of Health Research*, v.2, pp. 83-90.
- Ishiguro, K.; Nagata, S.; Fukumoto, H.; Yamaki, M.; Isoi, K. (1994). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. *Phytochemistry*, v.35, pp. 469-471.
- Jayasuriya, H.; McChesney, J. (1989). Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*. *Journal of Natural Products*, v.52, pp. 325-331.
- Jayasuriya, H.; Clarck, A.; McChesney, J. (1991). New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. *Journal of Natural Products*, v.54, pp. 1314-1320.
- Kong, C. K.; Kim, J.; Yoon, N.; Kim, S. (2009). Induction of apoptosis by phloroglucinol derivative from *Eklonia Cava* in MCF-7 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, v.47, pp. 1653-1658.
- Lin, C.N.; Wang, J.P.; Weng, J.R. (2006). *Patente N° U.S. Pat. Appl. Publ. USXXCO US20060205808 A1 20060914 CAN 145:342439 AN 2006:950572.*
- Lyketsos, C. G. (2010). The Interface Between Depression and Dementia: Where Are We With This Important Frontier? *American Journal of Geriatric Psychiatry*, v. 18, pp. 95-97.

Mendes, F.; Mattei, R.; Carlini, E. (2002). Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. *Fitoterapia*, v.73, pp. 462-471.

Moon, H.I. (2010). Antiplasmodial and cytotoxic activity of phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum* Thunb. *Phytotherapy Research*, v.24, pp. 941-944.

Moustapha, B.; Pereira-Miranda, R. (2007). Alcalóides pirrolizidínicos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, pp. 847-867.

Muller, W. (2003). St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research*, v.47, pp. 101-109.

*News Health*. (2011). Fonte: News Health- BBC: <http://www.bbc.co.uk/news/10507074>. Acessado em junho de 2012.

Nör, C.; Albring, D.; Ferra, A.B.F.; Schripsema, J.; Pires, V.; Sonnet, P.; Guillaune, D.; von Poser, G.L. (2004). Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the trigynobrathys section. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.32, pp. 517-519.

OMS.(2008).Fonte:[http://www.who.int/mental\\_health/management/depression/definition/en/](http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/). Acessado em junho de 2012.

Rates, S.; Von Poser, G.; Viana, A.; Costentin, J.; & Do Rego, J. (2010). *Patente Nº WO2010092162-A1*. Brasil/França.

Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M. A.; Stoeckli- Evans, H.; Thull, U.; Testa, B., *et. al.* (1994). An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v.36, pp. 1381-1385.

Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M. A.; Stoeckli- Evans, H.; Hostettmann, K. (1995). Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v.40, pp. 1447-1452.

Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.; Hostettmann, K. (1996). More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v.42, pp. 185-188.

Saczynski, J.; Beiser, A.; Seshadri, S. (2010). Depressive symptoms and risk of dementia The Framingham Heart Study . *Neurology*, v. 75, pp. 35-41.

- Savikin-Fodulovic, K.; Aljancic, I.; Vajs, V.; Menkovic, N.; Macura, S. (2003). Hyperatomarin, an antibacterial prenylated phloroglucinol from *Hypericum atomarum* ssp. *degenii*. *Journal of Natural Products*, v.66, pp. 1236-1238.
- Schmidt, S.; Jurgenliemk, G.; Skaltsa, H.; Heilmann, J. (2012). Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. *Phytochemistry*, v.77, pp. 218-225.
- Shanahan, P.; Glennon, J.D.; Crowley, J.J.; Donnelly, D.F.; O'Gara, F. (1993). HPLC assay of microbially derived phloroglucinol antibiotics in establishing the biosynthetic route to production, and the factors affecting their regulation. *Analytica Chimica Acta*, v.272, pp. 271-277.
- Simões, C.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. (2007). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC.
- Singh, I. P.; Bharate, S. B. (2006). Phloroglucinol compounds of natural origin. *Natural products Reports*, v.23, pp. 558-591.
- Tada, M.; Chiba, K.; Yamada, H.; Maruyama, H. (1991). Phloroglucinol derivatives as competitive inhibitors against thromboxane A<sub>2</sub> and leukotriene D<sub>4</sub> from *Hypericum erectum*. *Phytochemistry*, v.30, pp. 2559-2562.
- Tamminga, C.; Medoff, D. R. (2002). Diseases of the Mind and Brain: Overview. *American of Journal Psychiatry*, v.159, p. 917.
- Tanaka, N.; Kubota, T.; Ishiyama, H.; Araki, A.; Kashiwada, Y.; Takaishi, Y.; Mikami, Y.; Kobayashi, J. (2008). Petiolins A-C, phloroglucinol derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, pp. 5619-5623.
- Tanaka, N.; Kubota, T.; Ishiyama, H.; Kashiwada, Y.; Takaishi, Y.; Ito, J.; Mikami, Y.; Shiro, M.; Kobayashi, J. (2009a). Petiolins D and E, Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Heterocycles*, v.79, pp. 917-924.
- Tanaka, N.; Kubota, T.; Kashiwada, Y.; Takaishi, Y.; Kobayashi, J. (2009b). Petiolins F-I, benzophenone rhamnosides from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Chemical of Pharmaceutical Bulletin*, v.57, pp. 1171-1173.
- Tanaka, N.; Otani, M.; Kashiwada, Y.; Takaishi, Y.; Shibasaki, A.; Gono, T.; Shiro, M.; Kobayashi, J. (2010). Petiolins J-M, prenylated acylphloroglucinols

from *Hypericum pseudopetiolum* var. *kiusianum*. *Bioorganic and Medicinal Chemical Letters*, v.20, pp. 4451-4455.

Taylor, H.; Brooker, R. (1969). The isolation of uliginosin A and uliginosin B from *Hypericum uliginosum*. *Lloydia*, v.32, pp. 217-219.

Tiwari, A. (2004). Antioxidants: New-generation therapeutic base for treatment of polygenic disorders. *Current Science*, v.86, pp. 1092-1102.

Viana, A.; Do Rego, J.C.; von Poser, G.; Ferraz, A.; Heckler, A.; Costentin, J., *et al.* (2005). The antidepressant like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlttdl. (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology*, v.49, pp. 1042-1052.

Von Poser, G.; Rech, S.; Rates, S. (2006). *Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology - Chemical and Pharmacological Aspects of Southern Brazilian Hypericum Species*. Global Science Books, v.4, p.510-516.

Waterman, P.; Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Blackwell Scientific Publications*, pp. 20-23.

Wilson, R.; Arnold, S.; Beck, T.; Bienias, J.; Bennett, D. (2008). Change in Depressive Symptoms During the Prodromal Phase of Alzheimer Disease. *Archives of General Psychiatry*, v. 65, pp. 439-445.

Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. (2000). New phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *Journal of Natural Products*, v.63, pp. 104-108.

Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. (2001a). New prenylated Bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *Journal of Natural Products*, v.64, pp. 701-706.

Winkelmann, K.; Heilmann, J.; Zerbe, O.; Rali, T.; Sticher, O. (2001b). Further prenylated Bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *Helvetica Chimica Acta*, v.84, pp. 3380-3392.

Zanoli, P. (2004). Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drugs Reviews*, v. 10, pp. 203-218.

Objetivos



## 2 Objetivos

Planejar, sintetizar e testar os derivados do floroglucinol visando atividade contra enfermidades neurológicas como a depressão e a Doença de Alzheimer.

Esta Tese está estruturada em três capítulos:

### 2.1 Capítulo 1: Síntese de derivados do Floroglucinol

Objetivou-se nesta etapa do trabalho utilizar a metodologia da simplificação estrutural, desconstruindo a molécula das uliginosinas, para sintetizar compostos estruturalmente mais simples, análogos ao produto de partida.

### 2.2 Capítulo 2: Avaliação da atividade antidepressiva através do teste de suspensão pela cauda (TSC) e teste de campo aberto

Objetivou-se nesta etapa do trabalho testar os derivados sintetizados para a atividade antidepressiva através do TSC, um teste preditivo válido para tal atividade. Além de verificar, através do teste de campo aberto, se os compostos não produzem alteração na atividade motora dos animais.

### 2.3 Capítulo 3: Avaliação terapêutica dos derivados do floroglucinol para a Doença de Alzheimer

Objetivou-se nesta etapa do trabalho avaliar o potencial terapêutico dos compostos sintetizados previamente para a Doença de Alzheimer, através dos ensaios bioquímicos de inibição da acetilcolinesterase, de inibição da butirilcolinesterase, de inibição da proteína GSK-3 $\beta$ , de proteção do dano inflamatório produzido por lipopolissacarídeo (LPS) em células RAW 264.7, da atividade antioxidante e do ensaio de predição de permeação da barreira hematoencefálica.



# Capítulo 1

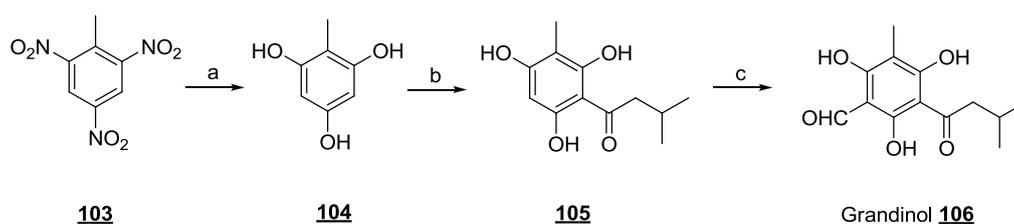


### 3 Capítulo 1- Síntese de Derivados do Floroglucinol

#### 3.1 Introdução

Os derivados do floroglucinol 1, além de isolados de plantas, também têm sido sintetizados ao longo das últimas décadas. São muitas as rotas sintéticas utilizadas para obtenção das mais diversas estruturas, desde as mais simples até as mais complexas. Dentre estas rotas sintéticas disponíveis na literatura, pode-se destacar a síntese de floroglucinóis acilados, isoprenilados, com adutos terpênicos, glicosídicos, diméricos, triméricos, halogenados, florotaninos e policetídeos cíclicos. Além da síntese total de compostos de interesse neste trabalho, como das uliginosinas A (101) e B (60).

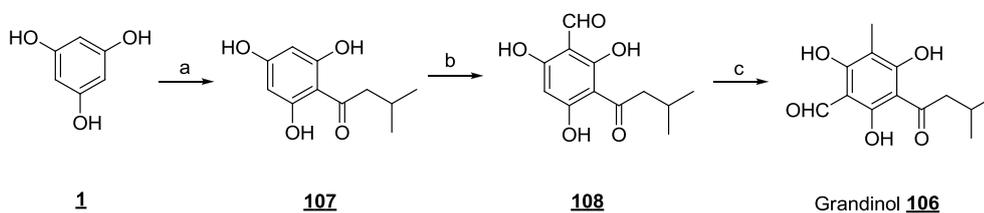
Dentre os compostos acilados mais descritos na literatura podemos destacar o grandinol 106, cuja primeira síntese foi descrita por Yuste e colaboradores (Yuste *et.al.*, 1978) realizada em 3 etapas, partindo do 2,4,6-trinitrotolueno 103. O composto 103 é reduzido, na presença de estanho e ácido clorídrico, a 2,4,6-triidroxitolueno 104 e acilado através de uma acilação de Friedel-Crafts na presença de cloreto de isovalerila e tetra cloreto de titânio, gerando 105, que na última etapa é formilado, na presença de éter diclorometil metílico e tetra cloreto de titânio como catalisador, para obter o grandinol 106 com 1,8% de rendimento global (Esquema 2).



Esquema 2: Condições - a) Sn/HCl, NaOH; b) Cloreto de isovalerila, TiCl<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CS<sub>2</sub>, 25°C; c) Éter diclorometil metílico, TiCl<sub>4</sub>, DCM, 0°C, 1h.

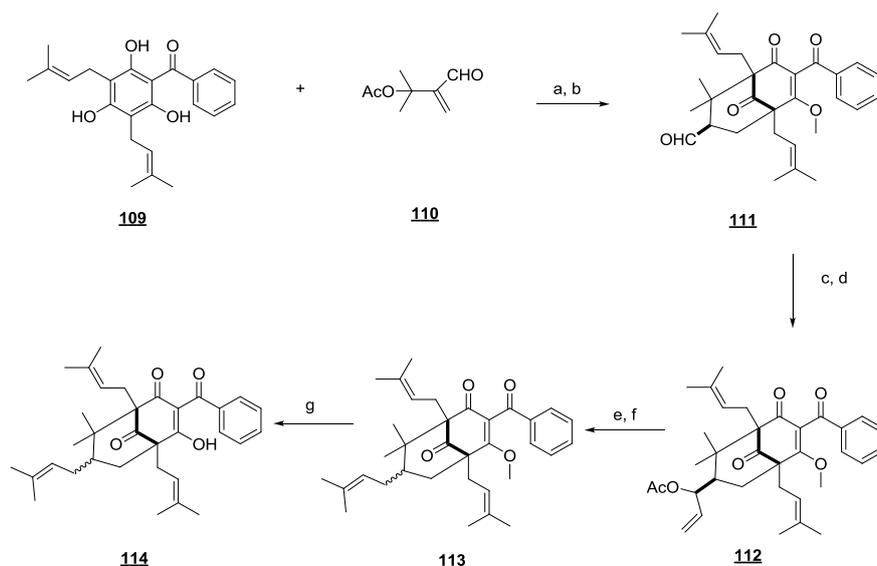
Este mesmo composto 106 também foi sintetizado em três etapas por Yoshida e colaboradores (Yoshida *et.al.*, 1985), partindo do floroglucinol 1. Nesta rota o floroglucinol 1 é acilado na presença de cloreto de isovalerila, formando o composto floroisovalerofenona 107 com 70% de rendimento. A

acilação foi seguida de uma formilação na presença de ortofomato de trietila gerando o composto **108** que é metilado na presença de iodometano em meio básico (Esquema 3).



Esquema 3: Condições - a) Cloreto de isovalerila,  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{PhNO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , t.a., 1h; b)  $\text{CH}(\text{OC}_2\text{H}_5)_3$ ,  $\text{AlCl}_3$ , DCM, 30 minutos; c)  $\text{CH}_3\text{I}$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ,  $\text{KOH}$ ,  $65^\circ\text{C}$ , 24h.

Os compostos isoprenilados também estão descritos na literatura e são obtidos através das mais diversas rotas sintéticas. O composto clusianona **114**, por exemplo, está descrito por mais de um grupo de pesquisa. A rota utilizada por Qi e Porco (2007) parte da clusiafenona **109** que após reagir com  $\alpha$ -acetoxi- enal **110** em presença de  $\text{KHMDS}$  gera o biciclo **111**, no qual o anel fenólico perde a sua aromaticidade. Após é adicionado ao aldeído o reagente de Grignard, seguido de acetilação do álcool resultante, gerando o acetato alílico **112**. Este mesmo composto **112** é reduzido na presença de paládio e logo convertido a clusianona metil éter **113** na presença do reagente de Grubs. Finalmente o composto **113** sofre uma demetilação na presença de hidróxido de lítio, gerando a clusianona **114** (Esquema 4).

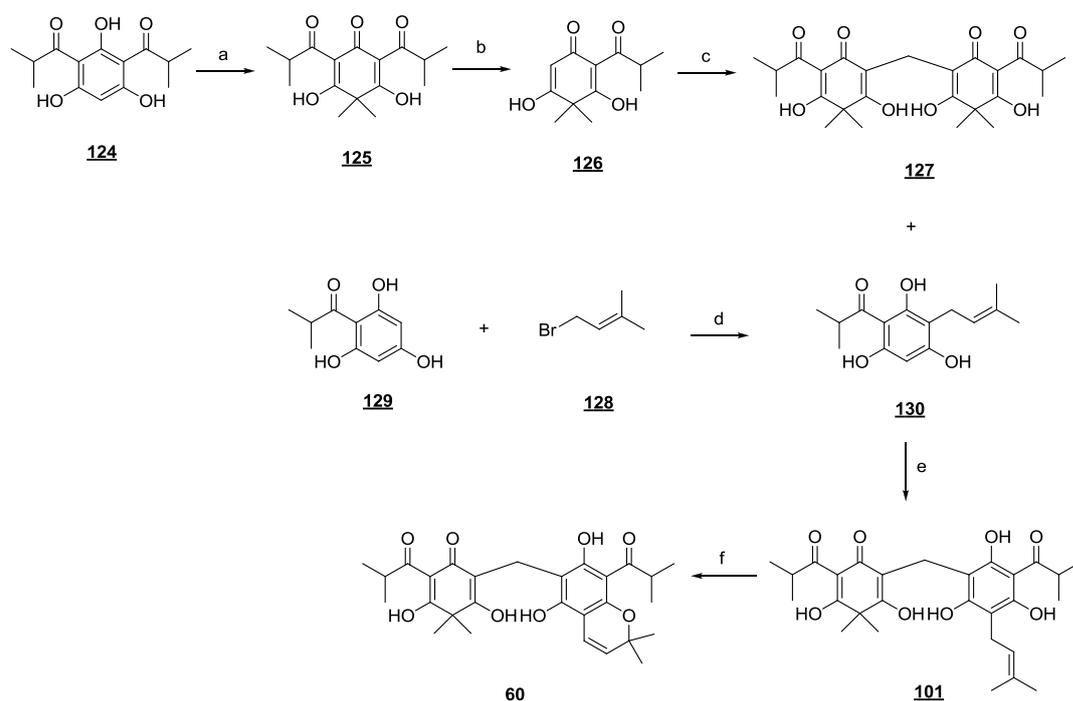


Esquema 4: Condições - a) KHMDS, THF, 65°C; b) TMSCHN<sub>2</sub>, *i*Pr<sub>2</sub>EtN, MeCN; c) CH<sub>2</sub>=CHMgBr, THF, -78°C; d) Ac<sub>2</sub>O, *i*Pr<sub>2</sub>EtN, DMAP, DCM, 0°C; e) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, HOC(O)NH<sub>4</sub>, tolueno, 105°C; f) Catalisador de Grubs de 2º geração, 2-metil-2-butenos; g) LiOH, dioxano, refluxo.

A síntese de derivados do floroglucinol, como os compostos do tipo euglobal, com adutos terpênicos, também está descrita na literatura. Dentre as rotas sintéticas destaca-se o trabalho de Singh e colaboradores de 2008, no qual foram sintetizados os compostos euglobal não naturais, G1 117 e G2 118, utilizando monoterpenos normalmente não encontrados nesta família de compostos naturais (Bharate *et.al.*, 2006 e 2008). Além destes dois compostos, também foram sintetizados outros derivados naturais utilizando esta mesma síntese biomimética. A estratégia sintética baseou-se numa reação multicomponente envolvendo uma condensação de Knoevenagel entre o isovalerilfloroglucinol 108 e o formaldeído 115, seguido de uma cicloadição de Diels-Alder [4+2] com o monoterpeno  $\alpha$ -pineno 116 (Esquema 5). O rendimento dos compostos é de 50-70%.

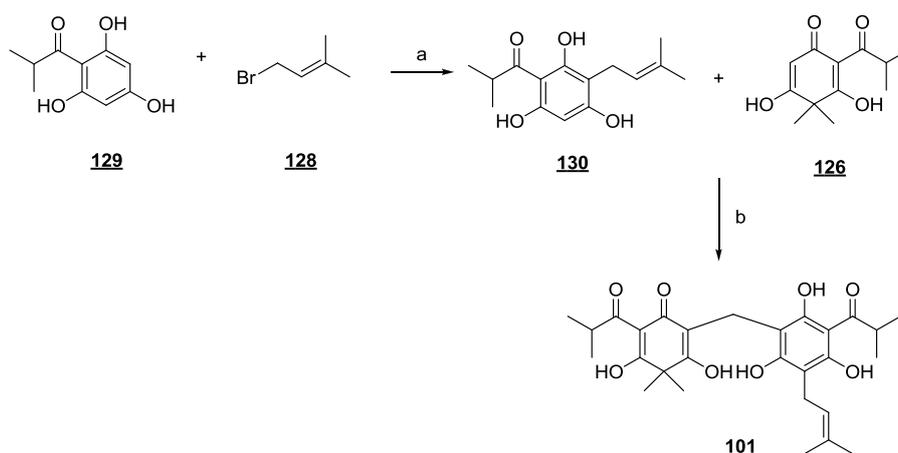


A síntese dos dímeros uliginosinas A (**101**) e B (**60**) também está descrita na literatura. A rota mais antiga é realizada em 3 partes (Esquema 8), conforme Meikle e Stevens (1978 e 1979), e inicia com a metilação do diisobutiril floroglucinol **124** gerando o composto **125**, seguido da obtenção do ácido monoisobutirilfilicínico **126** por uma hidrólise parcial, seguido de uma união de duas destas moléculas através de uma ponte metilênica na presença de formaldeído em meio aquoso alcalino, gerando o dímero **127**. Na segunda parte, o brometo de 3,3-dimetilalila **128** reage com a 2,4,6-triidroxiisobutirofenona **129** em meio aquoso alcalino gerando o composto **130**. A terceira parte consiste na reação entre os produtos **127** e **130** obtidos nas rotas anteriores, que em presença de hidreto de sódio e etanol gera a uliginosina A **101**, com 36% de rendimento global. Na última etapa, ao adicionar DDQ a uliginosina B **60** é formada, com 30% de rendimento global.



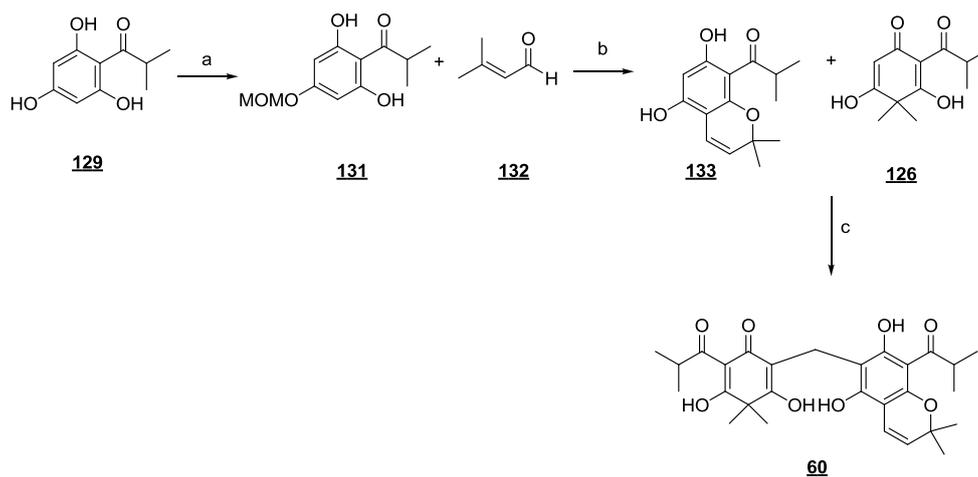
Esquema 8: Condições - a) Etóxido de sódio, iodometano, 10 minutos; b) Ácido sulfúrico, 40 minutos, aquecimento; c) KOH aq 10% com gelo picado, 1h 30 minutos; d) Brometo de 3,3-dimetilalila, KOH aq 1%, 15 minutos; e) NaH, etanol, refluxo, 45 minutos; f) DDQ, tolueno.

Mais recentemente, Kraus e Liu (2012) também apresentaram a síntese total das uliginosinas A 101 e B 60. A rota sintética da uliginosina A 101 possui apenas duas etapas e começa com a alquilação do monoisobutil floroglucinol 129 em presença de brometo de 3,3-dimetilalila 128, cloreto de cobre e carbonato de cálcio, gerando 130, que ao reagir com 126, em etanol e na presença de hidreto de sódio, forma a uliginosina A 101, com 63% de rendimento (Esquema 9).



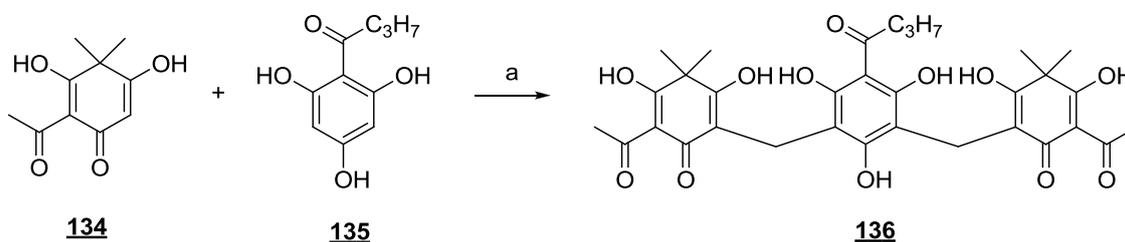
Esquema 9: Condições - a) CuCl, Na<sub>2</sub>C O<sub>3</sub>, água, éter etílico, t.a., 5 horas; b) NaH, etanol, refluxo, 45 minutos.

Já a síntese da uliginosina B 60, descrita neste mesmo trabalho (Kraus e Liu, 2012), possui três etapas e inicia com a proteção de duas hidroxilas de 129 com cloreto de éter metil clorometílico (MOM-Cl) e posterior desproteção seletiva de uma das hidroxilas com iodo, gerando 131. Na seguinte etapa, ocorre a ciclização do composto 131 com o aldeído 132, seguido da desproteção do grupo MOM em meio ácido, formando o benzopirano 133. Finalmente, ao reagir o composto 133 com 126 em presença de hidreto de sódio, é formada a uliginosina B 60, com 62% de rendimento (Esquema 10).



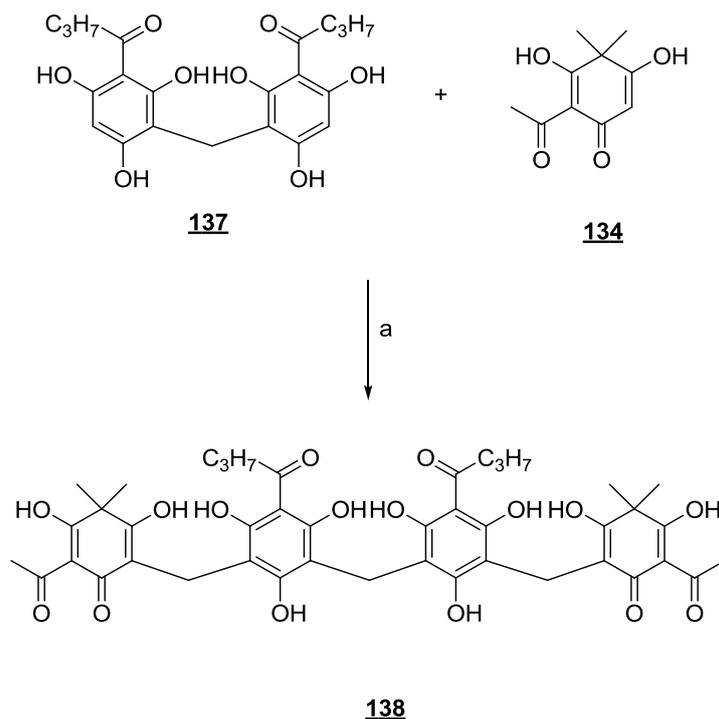
Esquema 10: Condições - a) MOMCl,  $iPr_2Net$ ,  $I_2$ , metanol; b) HCl 3N; c) NaH, etanol, refluxo, 45 minutos.

A síntese de moléculas maiores, derivadas do floroglucinol **1**, também está descrita na literatura e segue uma abordagem parecida àquela utilizada para a formação dos dímeros. Como exemplo destes compostos podemos citar o ácido filíxico ABA **136** (Hisada *et.al.*, 1972), sintetizado a partir do ácido acetilfilicínico **134** e da florobutiropfenona **135** (Esquema 11).



Esquema 11: Condições - a) Formaldeído, KOH aquoso.

O composto driocrassina **138** (Noro *et.al.*, 1973) é gerado a partir de bis-florobutiropfenona metileno **137** e do ácido acetilfilicínico **134** (Esquema 12).



Esquema 12: Condições - a) Formaldeído, KOH aquoso.

### 3.2 Planejamento: simplificação estrutural

A simplificação estrutural de compostos líderes é apropriada especialmente para substâncias naturais. Os compostos intermediários sintéticos estão quimicamente conectados aos produtos finais e como eles apresentam os mesmos substituintes é possível que compartilhem algumas propriedades farmacológicas. Nesta abordagem, pode-se fazer a identificação das partes da molécula que são essenciais para a atividade biológica esperada e daquelas que não são, já que as interações das moléculas com os receptores são bastante específicas. Portanto, uma pequena parte da molécula pode estar envolvida na interação com o receptor, sendo essencial para manter a integridade do composto e dos grupamentos farmacofóricos. Já outras partes podem estar interferindo de forma negativa e devem ser retiradas do composto líder (Wermuth, 2008).

Para a síntese dos derivados obtidos neste trabalho, foi utilizada a simplificação estrutural como ferramenta, na qual foram desenvolvidos compostos com substituintes semelhantes aos dos compostos líderes, porém na forma de monômeros de modo a avaliar a importância da unidade monomérica e

seus respectivos substituintes e a partir desta avaliação começar a sintetizar derivados dímeros. Partiu-se do floroglucinol 1 e utilizou-se a metodologia da síntese orgânica clássica. As reações desenvolvidas foram baseadas em experimentos previamente descritos na literatura, com estudo das condições reacionais.

O produto de partida floroglucinol 1 foi adquirido comercialmente na forma anidra da empresa Sigma Aldrich® e as modificações estruturais foram realizadas nas posições R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> e/ou R<sub>3</sub> (139) (Figura 20). Além disso, em algumas moléculas manteve-se o hidrogênio na posição R<sub>3</sub>, para posteriormente preparar dímeros através de uma reação de condensação. Esta condensação pode ser com a mesma unidade monomérica, ou com outras variações estruturais, formando a ponte metilênica.

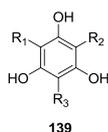


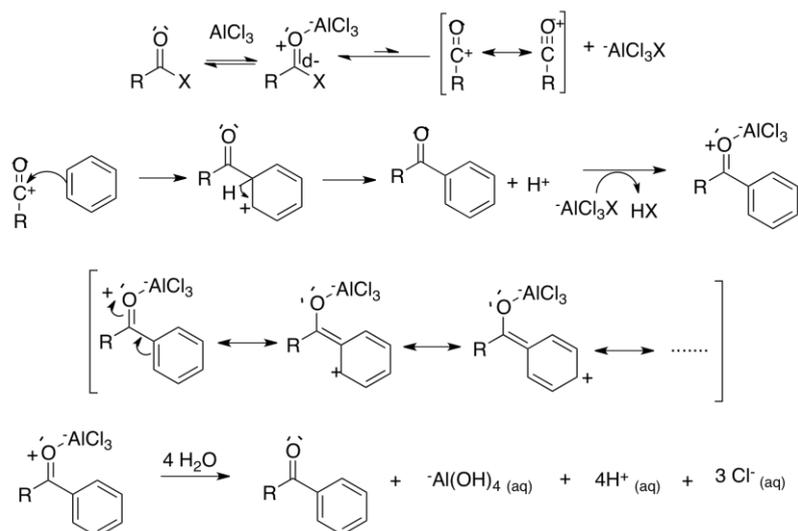
Figura 20: Estrutura do floroglucinol e as posições de substituição propostas neste trabalho.

### 3.3 Objetivo Específico

Utilizar a metodologia da simplificação estrutural, desconstruindo a molécula das uliginosinas, para sintetizar compostos estruturalmente mais simples.

### 3.4 Reações de Acilação

A síntese dos compostos inicia com a acilação de Friedel-Crafts, uma substituição eletrofílica aromática, que permite a síntese de produtos acilados entre anéis aromáticos e cloretos de acila ou anidridos. A monoacilação ocorre facilmente, porém a diacilação torna-se mais difícil, pois após a introdução do primeiro grupamento acila o anel fica menos ativado, devido o efeito retirador do grupamento carbonila. O mecanismo geral da reação está representado no Esquema 13 abaixo (Olah, 1963).



Esquema 13: Mecanismo geral da acilação de Friedel-Crafts (adaptado de Olah, 1963).

Nestas reações, o uso de quantidade insuficiente de catalisador diminui o rendimento global por causa da utilização incompleta do componente acila e também pode causar auto-condensação da cetona parcialmente complexada, como por exemplo, na formação da  $\beta$ -metilchalcona na acetilação do benzeno (Olah, 1963). Já um excesso de catalisador, muitas vezes, gera grandes quantidades de alcatrão. Neste tipo de reação, mesmo quando se emprega o equivalente molar adequado dos reagentes, as condições ótimas de acilação não são necessariamente atingidas (Olah, 1963). A ordem de adição dos reagentes também é importante na acilação de Friedel-Crafts. Quando o cloreto de alumínio e o componente acila reagem antes da adição final ao substrato, como no procedimento de Perrier, a proporção de catalisador para o componente acila permanece constante durante toda a reação e os resultados são reprodutíveis (Olah, 1963). No procedimento de Bouveault, no entanto, no qual o cloreto de acila é adicionado como reagente final, encontra-se uma contínua variação da proporção entre o catalisador e o componente acila. Este fato, por si só, pode explicar a não reprodutibilidade de muitas destas reações de acilação (Olah, 1963).

























































































### 3.11 Referências

Bachmann, W.; Wiselogle, F. (1934). Reduction by Magnesium + Magnesium Halide. XIII. The Reaction between Epoxy Ketones and Grignard Reagents. *Journal of American Chemical Society*, v. 52, n. 7, pp. 1559–1560.

Bharate, S., Bhutani, K., Khan, S., Tekwani, B., Jacob, M., Khan, I., et al. (2006). Biomimetic synthesis, antimicrobial, antileishmanial and antimalarial activities of euglobals and their analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, pp. 1750-1760.

Bharate, S., Khan, S., Tekwani, B., Jacob, M., Khan, I., & Singh, I. (2008). S-Euglobals: biomimetic synthesis, antileishmanial, antimalarial, and antimicrobial activities. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16, pp. 1328-1336.

Chauthe, S.K.; Bharate, S.B.; Sabde, S.; Mitra, D.; Bhutani, K.K.; Singh, I.P. (2010). Biomimetic Synthesis and anti-HIV activity of dimeric phloroglucinols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.18, pp. 2029-2036.

Chauthe, S.K.; Bharate, S.B.; Periyasamy, G.; Khanna, A.; Mishra, P.D.; Singh, I.P. (2012). One pot synthesis and anticancer activity of dimeric phloroglucinols. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 22, pp. 2251–2256.

Hisada, S., Shiraishi, K., & Inagaki, I. (1972). A new acylphloroglucinol from *Dryopteris dickinsii*. *Phytochemistry*, 11, pp. 1850-1851.

Huang, C.; Zhang, Z.; Li, Y. (1998). Total synthesis of (R,S)- Sophoraflavanone C. *Journal of Natural Products*, pp. 1283-1285.

Kawamura, Y. T. (1994). Studies of the Selective O-Alkylation and Dealkylation of Flavonoids. XVI. Demethylation of 2'-Methoxyacetophenones with Anhydrous Aluminum Chloride or Bromide in Acetonitrile. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v. 67, n. 2, pp. 511-515.

Keglevich, G.; Bálint, E.; Karsai, E.; Grun, A.; Bálint, M.; Greiner, I. (2008). Chemoselectivity in the microwave-assisted solvent-free solid-liquid phase benzylation of phenols: o- versus c-alkylation. *Tetrahedron Letters*, v. 49, pp. 5039-5042.

Kraus, G.; Liu, F. (2012). Synthesis of uliginosins A and B. *Natural Product Communications*, 7, pp. 1-2.

Kuhnke, J.; Bohlmann, F. (1985). Synthesis of naturally occurring phloroglucinol derivatives. *Tetrahedron Letters*, 26, pp. 3955-3958.

Lee, Y.; Li, X.; Kim, J. (2008). Concise total synthesis of biologically interesting mallotophilipens C and E. *Journal of Organic Chemistry*, pp. 4313-4316.

Meikle, T. A.; Setevens, (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*, v. 11, pp. 1303-1312.

Meikle, T. A. (1979). Beta-Tricarbonyl compounds. Part 2. Synthesis of 5,7-dihydroxy-8-isobutyryl-2,2-dimethyl-2H-chromen and the antibiotics uliginosin B-iBiB and uliginosin B-iBiV. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, pp. 2563 - 2573.

Mondal, M. P. (2007). A facile phenol-driven intramolecular diastereoselective thermal/ base-catalyzed dipolar [2 + 2] annulation reactions : An easy access to complex bioactive natural and unnatural benzopyran congeners. *Journal of organic chemistry*, v. 72, n. 6, pp. 2068-2076.

Noro, Y., Okuda, K., & Shimada, H. (1973). Dryocrassin: A new acylphloroglucinol from *Dryopteris crassirhizoma*. *Phytochemistry*, 12, pp. 1491-1492.

Olah, G. (1963). *Friedel-Crafts and Related Reactions*. New York/London: Interscience Publishers.

Paruch, K. K.C. (2000). First Friedel-Crafts Diacylation of a Phenanthrene as the Basis for an Efficient Synthesis of Nonracemic [7]Helicenes. *Journal of Organic Chemistry*, n. 65, pp. 7602-7608.

Pettigrew, J.D.; Cadieux, J.A.; So, S.S.S.; Wilson, P.D. (2005). Phenylboronic acid mediated triple condensation reactions of phloroglucinol and unsaturated carbonyl compounds. *Organic Letters*, v. 7, pp. 467-470.

Polo, E.; da Silva-Filho, L.; da Silva, G.; Constantino, M. (2008). Síntese de 1-indanonas através da reação de acilação de Friedel-Crafts intramolecular utilizando NbCl<sub>5</sub> como ácido de Lewis. *Química Nova*, v.31, n.4, pp. 763-766.

Qi, J.; Porco, J. (2007). Rapid Access to Polyprenylated Phloroglucinols via Alkylative Dearomatization-Annulation: Total Synthesis (±)-Clusianone. *Journal of American Chemical Society*, 129, pp. 12682-12683.

Sarvari, M. H. (2004). Reactions on a Solid Surface. A Simple, Economical and Efficient Friedel-Crafts Acylation Reaction over Zinc Oxide (ZnO) as a New Catalyst. *Journal of Organic Chemistry*, v. 69, n. 20, pp. 6953-6956.

Singh, I.P.; Sidana, J.; Bharate, S.B.; Foley, W.J. (2010). Phloroglucinol compounds of natural origin: Synthetic aspects. *Natural Products Report*, v. 24, pp. 393-416.

Wermuth, C.G. (2008). *The Practice of Medicinal Chemistry*. Amsterdam: Elsevier, 942 páginas, terceira edição.

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

Yuste, F., Sanchez-Obregon, R., & Walls, F. (1978). The synthesis of grandinol. *Tetrahedron Letters*, 19, pp. 4869-4870.



## Capítulo 2



## 4 Capítulo 2- Ensaios farmacológicos para atividade antidepressiva

### 4.1 Introdução

Segundo a OMS (2008), dentre os transtornos depressivos, a depressão unipolar é uma desordem mental que afeta em torno de 121 milhões de pessoas ao redor do mundo. Os sintomas depressivos podem se agravar ou até mesmo tornar-se repetitivos, prejudicando as responsabilidades da vida cotidiana dos pacientes que apresentam este transtorno. Com a progressão da doença, algumas pessoas podem cometer o suicídio, causa de mais de 850 mil mortes ao ano (OMS, 2008), o que representa que mais de 90% dos casos de suicídio no mundo são cometidos por estes pacientes (OMS, 2008). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008), relatam que a depressão unipolar é considerada a terceira doença mais incapacitante, em termos de ‘anos de vida ajustados para incapacidade’ (disability-adjusted life years - DALY’s). Projeta-se que, em 2020, a depressão estará em segundo lugar no ranking DALYs, atingindo tanto homens como mulheres em todas as idades. Atualmente a depressão é a segunda causa de DALYs em ambos os sexos, na faixa etária de 15 a 44 anos, e pode ser diagnosticada ainda na atenção primária. Cerca de 60-80% dos enfermos tem acesso aos medicamentos, porém em alguns países apenas 10% destas pessoas recebem o tratamento adequado (OMS, 2008).

A depressão pode ocorrer devido a muitos fatores externos como, por exemplo, a perda de um parente ou amigo próximo, perda de emprego ou devido à uma doença grave (Pittenger e Duman, 2008). O paciente é diagnosticado com depressão a partir do momento em que ele apresenta pelo menos 5 dos sintomas descritos abaixo, segundo o DSM-IV (2004), acompanhados de humor deprimido ou anedonia (perda ou ausência da capacidade de ter prazer), durante no mínimo duas semanas. Os sintomas mais comuns são perda ou ganho de peso com excesso ou diminuição de apetite, insônia ou hipersônia quase todos os dias, agitação ou retardo psicomotor, fadiga ou perda de energia, sentimentos de

inutilidade ou culpa excessiva, diminuição da habilidade de pensar, de se concentrar ou de tomar decisões, pensamentos recorrentes de morte com ideias

ou planos de suicídio. Estes sintomas causam significativo sofrimento e prejuízo no âmbito social e ocupacional. O impacto da doença na qualidade de vida é comparável com a de uma enfermidade grave, dependendo da severidade dos sintomas é considerada desabilitadora da função psicossocial (Chopra, 2011).

## 4.2 Patologia da Depressão

A depressão maior é uma desordem que se manifesta com sintomas psicológicos, comportamentais e fisiológicos (Lemke e Williams, 2008, Möller et al., 2012). A patogênese da depressão é multifatorial e algumas das hipóteses relacionadas a esta enfermidade são: o estresse oxidativo, a produção de óxido nítrico, o aumento de citocinas pró-inflamatórias, a desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), os fatores neurotróficos reduzidos, a redução da transmissão monoaminérgica no cérebro e a redução da função de receptores de neurotransmissores (Berton e Nestler, 2006).

A redução da transmissão monoaminérgica no cérebro é a hipótese mais estudada na fisiopatologia da depressão. Níveis reduzidos de metabólitos de serotonina ou norepinefrina foram detectados no fluido cérebro espinhal de indivíduos deprimidos (Ansorge *et.al.*, 2007). Com a deficiência de monoaminas, mudanças na função dos receptores podem ser também uma das causas de depressão. O número e as afinidades dos receptores são regulados por vários fatores como a concentração do neurotransmissor levando a uma alta ou baixa da regulação na proteína do receptor (Bondy, 2002). A maioria dos medicamentos antidepressivos disponíveis atualmente foram desenvolvidos com base nos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase, com base na teoria monoaminérgica da depressão (Berton e Nestler, 2006). Antidepressivos de segunda geração e os atípicos, que atuam no sistema monoaminérgico de maneira mais específica, apresentam efeitos adversos mais brandos e são mais bem tolerados pelos pacientes, porém não apresentam uma melhora substancial sobre

sua eficácia, e somente 50% dos pacientes apresentam uma remissão completa dos sintomas da doença (Berton e Nestler, 2006; Porcelli *et al.*, 2011).”

O estresse oxidativo está implicado em muitas doenças e pode ser um mecanismo patogênico comum a muitas desordens psiquiátricas, já que o cérebro está sujeito a danos oxidativos (Eren *et al.*, 2007). Existem muitos estudos que indicam que danos cerebrais induzidos por substâncias reativas de oxigênio (ROS) tem um importante papel na fisiopatologia da depressão (Eren *et al.*, 2007). O cérebro possui muitos mecanismos antioxidantes, porém quando está acometido com esta enfermidade, a falha nestes mecanismos e a alteração no sistema de citocinas pró-inflamatórias, aumenta a formação de radicais livres devido a ativação de células fagocíticas. A depressão é caracterizada pela ativação da resposta inflamatória com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias que juntamente com ROS citocinas-induzidas podem aumentar peroxidação lipídica (Eren *et al.*, 2007). Bilici e colaboradores (2001) constataram, através da análise de plasma e/ou células vermelhas, que o nível da peroxidação de lipídeos em córtex cerebral de humanos foi aumentado mediante depressão induzida por estresse leve a crônico, embora os níveis de atividade de glutathione peroxidase e de antioxidantes monoenzimáticos tenham diminuído. A ativação de células imunes por citocinas pró-inflamatórias leva a uma maior produção de ROS, que ocasiona um aumento da peroxidação de lipídeos como malonildialdeído interferindo na fluidez de membranas biológicas. Neste mecanismo ocorre um aumento da flexibilidade das cadeias fosfolipídicas e diminuição da fluidez da membrana plasmática. Essa modificação pode induzir também mudanças conformacionais em receptores e em canais iônicos, influenciando com isso funções fisiológicas (Clarke *et al.*, 1999).

O óxido nítrico tem sido considerado como uma molécula mensageira no cérebro. Muitas das ações fisiológicas do óxido nítrico são mediadas através de interações com a guanilato ciclase, levando à ativação da enzima e conseqüente aumento da guanosina cíclica monofosfato (Kaster *et al.*, 2005). O óxido nítrico

sintetizado a partir da *L*-arginina pela óxido nítrico sintase (NOS) está implicado em neurotransmissão, plasticidade sináptica, aprendizado, percepção da dor, agressão e depressão (Esplugues, 2002). Dentro do cérebro, a óxido nítrico sintase é encontrada em muitas áreas associadas com estresse e depressão, como o hipocampo, hipotálamo e no núcleo dorsal da rafe. Estudos indicam que a redução dos níveis de óxido nítrico no hipocampo pode produzir efeitos antidepressivos, demonstrando que os níveis de óxido nítrico no hipocampo podem estar implicados com a neurobiologia do estresse e da depressão (McLeod *et.al.*, 2001).

O mecanismo do efeito das citosinas no comportamento pode estar relacionado em parte aos seus efeitos na neurotransmissão e na função neuropeptídica, na plasticidade sináptica e na função neuroendócrina. Os efeitos das citosinas na função neuroendócrina na depressão podem estar relacionada em parte aos seus efeitos no receptor glicocorticóide (GR) e nas suas vias de sinalização levando à resistência de glicocorticóides (Raison *et.al.*, 2006). Fitzgerald e colaboradores (2006) verificaram o aumento dos níveis do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) no plasma, associado à resposta de redução de vasoconstrição em tratamentos de pacientes deprimidos com glicocorticóides. São muitos os estudos nesta área, indicando que as interações recíprocas entre o sistema nervoso e o sistema imune são importantes na patofisiologia da depressão. Estes estudos sugerem que as citosinas pró-inflamatórias como a interleucina-6 e o TNF- $\alpha$  desempenham um papel importante no desenvolvimento da depressão e podem mediar suas manifestações psicológicas, comportamentais e neurobiológicas (Schiepers *et.al.*, 2005).

A hiperatividade do eixo HPA também é um alvo importante no tratamento da depressão. Existe uma correlação entre distúrbios do humor e níveis anormais de corticóides no organismo (de Kloet *et.al.*, 2005). Estímulos estressantes ativam o hipotálamo, que ativa o hormônio de liberação de corticotrofina/ fator de liberação de corticotrofina. A corticotrofina atua na

glândula adrenal, liberando o hormônio adrenocorticotrófico na corrente sanguínea, levando a uma liberação de cortisol que exerce um feedback negativo para diminuir a resposta ao estresse. O estresse que excita o hipotálamo desencadeará a ação no eixo HPA e elevará rapidamente a quantidade de glicocorticóides preparando o organismo para as reações de luta ou fuga. Com o uso de antidepressivos inibe-se a glicoproteína P (responsável pela extrusão de cortisol das células), aumentando a quantidade de cortisol disponível ao cérebro e realizando um *feedback* negativo do eixo HPA (Lemke e Williams, 2008).

A hipótese do fator neurotrófico também é tida com uma das possíveis causas da depressão. Esta hipótese é discutida em estudos pré-clínicos e clínicos onde em casos de estresse e de depressão, verifica-se a redução do volume total do hipocampo e a perda de células do sistema límbico (Frodl *et.al.*, 2007; Czeh e Lucassen, 2007). A morte celular pode ocorrer por diversos mecanismos propostos, como por elevados níveis de glicocorticóides e neurotransmissores excitatórios, mudanças nas células gliais ou pela supressão secundária da neurogênese (McEwen, 2007; Longone *et.al.*, 2008). De acordo com esta hipótese, o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) é de suma importância, pois modula a plasticidade, inibe as cascatas de morte celular e aumenta as proteínas de sobrevivência celular que são responsáveis pela proliferação e manutenção dos neurônios (Peng *et.al.*, 2008). Estudos sugerem que o estado depressivo em modelos animais está associado com a redução dos níveis de BDNF no cérebro (Shirayama *et.al.*, 2002).

### 4.3 Diagnóstico

Além da elaboração do diagnóstico de depressão, é importante também fazer a mensuração da gravidade dos sintomas da doença. No diagnóstico é avaliada a presença ou a ausência de um conjunto de características clínicas (presença e padrão de sintomas, duração dos mesmos e curso). As escalas de avaliação da depressão ajudam na avaliação dos sintomas e na elaboração do

próprio diagnóstico, além de auxiliarem o acompanhamento do paciente e o resultado dos tratamentos (*American Psychiatric Association*, 1994).

As escalas de auto-avaliação apresentam algumas vantagens de uso em pacientes com transtornos do humor, pois os mesmos estão numa posição única para fornecer informações sobre seus sentimentos e humor (Murphy *et. al.*, 1982). Porém também possuem desvantagens: sua confiabilidade é difícil de analisar; a sua utilização pressupõe pacientes com certo grau de educação, cooperantes e sem uma psicopatologia grave (ex.: depressões graves tornam os pacientes incapazes de se concentrar; psicoses acompanham-se de diminuição ou perda de julgamento/crítica ou de reconhecimento dos sintomas). A avaliação dos sintomas depressivos depende das várias categorias de sintomas que serão incluídos nos itens de cada escala, sendo exatamente nisso que as mesmas se diferenciam. De acordo com Thompson (1989), as principais categorias de sintomas depressivos são: tristeza, perda de interesse e/ou prazer, crises de choro, variação diurna do humor, que estão enquadrados como sintomas do humor; alterações no sono (insônia ou hipersônia), no apetite e no peso, perda de libido e fadiga, que são considerados vegetativos ou somáticos; inibição ou retardo, agitação (frequente em idosos), inquietação, considerados sintomas motores; apatia, isolamento, incapacitação para o desempenho das tarefas cotidianas, considerados sintomas sociais; desesperança, desamparo, ideias de culpa e de suicídio, indecisão, perda do reconhecimento de que está doente, características de sintomas cognitivos; ansiedade psíquica, somática e fóbica, que são sintomas de ansiedade e por fim, hostilidade consigo e com os demais, características de irritabilidade.

A escala mais utilizada é a de avaliação de depressão de Hamilton, que se tornou o "padrão ouro" para avaliação da gravidade, de modo que as escalas desenvolvidas posteriormente são comparadas a ela quanto à confiabilidade e à validade. Embora planejada para quantificar a gravidade de um grande número de sintomas depressivos, as manifestações somáticas e os aspectos cognitivos são as categorias de sintomas mais focalizadas. Esta escala vem sendo utilizada e

aprimorada no decorrer das últimas décadas, sendo incluídos em alguns casos outros critérios de avaliação como: desesperança, desamparo e auto desvalorização, além de itens adicionais para avaliar os sintomas atípicos. Esses sintomas atípicos são freqüentemente observados em pacientes que apresentam um padrão sazonal na recorrência dos episódios. Com a adição destes itens foi elaborado um guia para entrevista estruturada para obter informações e preencher a Escala de Hamilton para depressão (Williams *et. al.*, 1990).

#### 4.4 Tratamento

Existe atualmente no mercado uma quantidade considerável de antidepressivos, mas aproximadamente 30% dos pacientes tratados não respondem ao tratamento. Isso se deve a fatores como efeitos colaterais com baixa adesão ao tratamento, além das possíveis causas da doença, já que o mecanismo de como ocorre a depressão ainda não está totalmente elucidado (Chopra, 2011). Na tabela abaixo encontram-se as principais classes de antidepressivos com seus principais representantes (Chopra, 2011), de forma resumida (Tabela 7).

Tabela 7: Antidepressivos utilizados na terapêutica atual (tabela adaptada de Chopra, 2011).

Classe	Representantes	Outros usos clínicos	Segurança	Problemas de descontinuação
Inibidores da Recaptação Seletiva de Serotonina	Citalopram Escitalopram Fluoxetina Paroxetina Sertralina	Ansiedade	Baixa toxicidade com sobredoses, potencial variado na interação com drogas tóxicas	Maior frequência com paroxetina e menor com fluoxetina
Inibidores da recaptação de serotonina e	Venlafaxina Duloxetina	Ansiedade Incontinência	Baixa toxicidade com sobredoses	Frequente

norepinefrina		urinária		
Inibidor da recaptação norepinefrina e dopamina	Bupropiona	Anti-tabagismo	Toxicidade neurológica em sobredoses, potencial variado na interação com drogas tóxicas	Frequente
Antidepressivos tricíclicos	Amitriptilina Amoxapina Doxepina Imipramina Nortriptilina	Síndrome obsessivo-compulsiva, Síndrome do pânico e enurese noturna	Toxicidade cardíaca e neurológica em sobredoses, potencial para interações tóxicas	Bastante frequente
Inibidor da recaptação de noradrenalina	Reboxetina	Distúrbios do sono	Efeitos secundários como tonturas e distúrbios urinários	Não muito frequente
Inibidor da recaptação e antagonista de serotonina	Tradazona	Insônia	Efeitos secundários incluem sedação e hipotensão postural	Não muito frequente
Inibidores da monoaminoxidase	Isocarboxazida Fenelzina	Síndrome do pânico e distúrbios de ansiedade social	Tontura, hipotensão postural, dor de cabeça, efeitos anticolinérgicos	Frequente

Inibidor reversível da monoamino oxidase	Moclobemida	Distúrbios de ansiedade social	Bem tolerado	Não muito frequente
Antidepressivos serotoninérgico específico e noradrenérgico	Mirtazapina Mainserina	-----	Efeitos secundários como sedação e ganho de peso	Não reportados
Fitoterápicos	St. Johns' Worth	-----	Sedação e interação com outros medicamentos	Não reportados

Os inibidores de recaptção de serotonina são os antidepressivos mais prescritos e são os medicamentos de primeira linha para tratamento da depressão maior (Lemke e Williams, 2008). Existem diferenças na tolerância quando se comparam os medicamentos das diferentes classes. Quando comparados aos antidepressivos tricíclicos, os inibidores da recaptção de serotonina provocam mais náuseas, diarreias, agitação, disfunção sexual, anorexia, insônia, nervosismo e ansiedade. Já os tricíclicos causam mais cardiotoxicidade, boca seca, constipação, tontura, sudorese e visão borrada (Lemke e Williams, 2008). Para que os antidepressivos comecem a fazer o seu efeito desejado, precisam ser administrados regularmente pelo menos por duas a três semanas, sendo que durante este tempo a dose e a administração conjunta com outros medicamentos podem ser ajustadas. Muitos pacientes interrompem o tratamento durante essas primeiras semanas devido aos sintomas adversos ou por achar que o medicamento não está fazendo o seu efeito. A interrupção do tratamento ocorre também muitas vezes após o paciente começar a perceber os efeitos positivos da medicação (Lemke e Williams, 2008). O tratamento deve ser realizado por no mínimo quatro a nove meses, dependendo do caso, podendo ser estendido

conforme orientação médica, para evitar a recorrência da doença (Lemke e Williams, 2008). Os antidepressivos alteram a química do cérebro e por isso devem ser retirados gradualmente ao fim do tratamento, possibilitando que o organismo se ajuste à retirada da medicação. Se o tratamento é descontinuado abruptamente, pode causar efeitos bastante intensos como náusea, vômito, anorexia, dor de cabeça, inquietação, agitação, calafrios, insônia e em alguns casos hipomania, pânico e ansiedade, e inquietação motora extrema, principalmente se o tratamento é interrompido após oito semanas (ocorre especialmente em inibidores da MAO) (Lemke e Williams, 2008).

#### 4.5 Estudo de espécies de *Hypericum*

Os extratos de *Hypericum perforatum* têm demonstrado um modo de ação diferente dos antidepressivos já existentes no mercado (Muller *et.al.*, 2003; Chatterjee *et.al.*, 1998; Bhattacharya *et.al.*, 1998; Kumar *et.al.*, 2000). Franklin e colaboradores (2004) demonstraram que a administração do extrato de *H. perforatum* diminui os níveis de corticosterona em córtex pré-frontal de ratos sem afetar os níveis plasmáticos. Simmen e colaboradores (2003) mostraram em seus estudos *in vitro* que algumas das substâncias encontradas no seu extrato podem atuar como antagonistas do fator de liberação de corticotrofina. Além disso, foi constatado que *H. perforatum* provoca um aumento dos níveis extracelulares de dopamina e serotonina (5-HT) e não causa alterações nos níveis de noradrenalina (NA) (Di Matteo *et.al.*, 2000; Rommelspacher *et.al.*, 2001; Yoshitake *et.al.*, 2004), e que a hiperforina 99 estimula a liberação de acetilcolina no hipocampo de ratos através de um mecanismo indireto (Kiewert *et.al.*, 2004). Além disso, age inibindo a recaptação de noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), dopamina, ácido gama-aminobutírico (GABA) e glutamato, através de um mecanismo que não está diretamente relacionado ao bloqueio do sítio de recaptação desses neurotransmissores (Kaehler *et.al.*, 1999; Muller *et.al.*, 2001; Gobbi *et.al.*, 2001; Jensen *et.al.*, 2001). Alguns trabalhos sugerem que a hiperforina 99 inibe a recaptação vesicular das monoaminas alterando a

condutividade dos canais de sódio (Singer *et.al.*, 1999), interferindo na fluidez das membranas neuronais (Eckert *et.al.*, 2001 e 2004; Muller *et.al.*, 2001) e atuando sobre o eixo HPA (Butterweck *et.al.*, 2004; Murck *et.al.*, 2004). A atividade deste composto 99 foi demonstrada através de diferentes modelos animais validados para depressão como o teste da natação forçada, o teste de suspensão pela cauda, o teste do desamparo aprendido e deficiência na fuga induzida por estresse inescapável (Butterweck, 2003, Cervo, 2002; Chatterjee, 1998; Gambarana, 2001; Zanolli, 2004). A hiperforina 99 apresentou atividade antidepressiva no teste de suspensão pela cauda com doses entre 4 e 8 mg/kg, reduzindo significativamente o tempo de imobilidade, porém foi inativa em doses tanto maiores quanto menores (Butterweck, 2003).

Dentre as espécies brasileiras mais estudadas de *Hypericum*, o *H. caprifoliatum* (Daudt *et.al.*, 2000) e o *H. polyanthemum* (Gnerre *et.al.*, 2001) apresentaram os melhores resultados no teste de natação forçada. Já os extratos de *H. brasiliense* (Rocha *et.al.*, 1994), *H. caprifoliatum*, *H. piriiai* e *H. polyanthemum* (Gnerre *et.al.*, 2001) apresentaram atividade como inibidor da MAO *in vitro*.

Em outro estudo (Viana *et.al.*, 2005), constatou-se que os extratos cicloexano de *H. caprifoliatum* apresentaram, *in vivo*, efeito sobre a transmissão dopaminérgica, no qual o efeito anti-imobilidade no teste de natação forçada foi prevenido com uma administração prévia de sulpirida ou SCH 23390 (antagonistas de receptores dopaminérgicos D2 e D1, respectivamente). Além disso, constataram que os extratos e os compostos isolados inibiram a captação e aumentaram a liberação de monoaminas, principalmente de dopamina, em sinaptossomas de ratos, porém sem ligarem-se a transportadores monoaminérgicos, sugerindo um mecanismo de ação diferente de outras classes de antidepressivos (Viana *et.al.*, 2008).

A uliginosina B 60, isolada do *Hypericum polyanthemum* (Nör *et al.*, 2004), demonstrou *in vivo* atividade antidepressiva e antinociceptiva (Stein *et. al.*, 2012; Stolz *et.al.*, 2012), além de inibir *in vitro* a recaptação de serotonina

(IC<sub>50</sub> = 252 ±13 nM), noradrenalina (280 ±48 nM) e dopamina (IC<sub>50</sub> = 90 ±38 nM), porém não apresentou afinidade pelos transportadores específicos de monoaminas.

As espécies nativas de *Hypericum* do Rio Grande do Sul tem se mostrado boas fontes de compostos capazes de diminuir a imobilidade de roedores em modelos animais validados para depressão.

#### 4.6 Modelos animais

Mimetizar a depressão em animais de laboratório é um desafio para os pesquisadores, pois sintomas como humor deprimido e pensamentos suicida não são possíveis de serem determinados em animais (Cryan *et.al.*, 2005). Além disso, os fatores genéticos que também podem desencadear a doença não podem ser mensurados. Deste modo, os modelos validados para determinar a atividade antidepressiva baseiam-se nos mecanismos já conhecidos da doença ou na resposta ao estresse (Porsolt, 2000). A Tabela 8 abaixo apresenta sucintamente os testes validados atualmente para avaliar a atividade antidepressiva em roedores (Chopra, 2011).

Tabela 8: Modelos animais utilizados para avaliar atividade antidepressiva (tabela adaptada de Chopra, 2011).

Modelo	Breve descrição do modelo
Teste da Natação Forçada (TNF)	Animais são expostos à natação forçada em um recipiente de vidro. O aumento do período de imobilidade do animal indica um estado de depressão. Neste modelo o uso de antidepressivos diminui o tempo de imobilidade, estimulando o animal a nadar por mais tempo.
Teste de suspensão pela cauda (TSC)	Os animais (neste caso apenas camundongos) são suspensos pela cauda, que é presa com fita adesiva em superfície fixa, e é observado o tempo de imobilidade. Os antidepressivos diminuem o tempo de imobilidade.
Desamparo Aprendido	Os animais são submetidos a choques nas patas e tendem a levar muito tempo para escaparem desta situação. Os antidepressivos

		diminuem esse tempo de escape e provocam uma diminuição nas fugas mal-sucedidas.
Estresse Crônico	Leve	Os animais são submetidos a estressores moderados de forma crônica e não previsíveis como frio, alteração do ciclo claro-escuro, choques nas patas, privação de comida e água e pinçar a cauda, e em função disso, o consumo e preferência por água com sacarose diminuem. Tal redução costuma ser considerada uma medida de anedonia, sintoma central da depressão em humanos.
Estresse Social		Os animais são expostos a diversos estresses sociais como a proximidade a machos dominantes ou odores de predadores naturais, e apresentam comportamentos anormais. Este é um ensaio de difícil reprodução, visto que o comportamento apresentado pelos animais nem sempre são os mesmos. Este problema é encontrado principalmente quando se testam camundongos.
Estresse da Separação Precoce		Os animais são separados das suas mães ainda muito jovens, e apresentam comportamento persistente e anormalidades no eixo HPA quando adultos. Alguns desses comportamentos podem ser revertidos com tratamento antidepressivo.
Indução de Lesão no Bulbo Olfativo		Os animais que sofrem lesões químicas ou cirúrgicas no bulbo olfativo apresentam anormalidades no comportamento. Alguns desses comportamentos podem ser revertidos com tratamento antidepressivo.
Medo condicionado ao contexto		Os animais apresentam medo como resposta a estímulos neutros como tom de voz ou o próprio contexto como a sua gaiola, anteriormente associados a estímulos aversivos como choques.
Testes baseados na ansiedade		Os animais aumentam a sua capacidade exploratória de ambientes como campo aberto, claro-escuro e labirinto em cruz elevado, quando tratados com ansiolíticos como por exemplo benzodiazepínicos.
Testes baseados na recompensa		Animais apresentam respostas altamente reprodutivas a drogas de abuso, comida e sexo no condicionamento clássico e ensaios de

	condicionamento operantes. Como exemplos destes testes: preferência por local condicionado, auto-administração de drogas, reforço condicionado e ensaios de auto-estimulação intracraniana.
Testes baseados na cognição	Os animais são avaliados quanto às suas habilidades de aprendizado, atenção e memória (labirinto de água de Morris, labirinto de braço radial, labirinto em T e teste das cinco escolhas seriadas).

Dentre estes modelos animais, os mais utilizados para determinar a atividade antidepressiva, são os testes da natação forçada e o teste de suspensão pela cauda. O Teste de Natação Forçada (TNF), considerado de severidade moderada, foi introduzido por Porsolt e colaboradores em 1978 como um modelo animal sensível ao tratamento com antidepressivos e, posteriormente, considerado como modelo experimental de depressão. Consiste em que ratos ou camundongos forçados a nadar de forma inescapável, em um espaço restrito, tornam-se imóveis após vigorosa atividade. Este comportamento de imobilidade foi interpretado por Porsolt como perda de motivação ou “desespero comportamental” e é usualmente prevenido pela administração de antidepressivos. Um tipo de protocolo consiste em administrar as soluções por via oral e após 60 minutos os camundongos são colocados a nadar em recipientes cilíndricos de 10 cm de diâmetro e 25 cm de profundidade, com água a 19 cm de altura, numa temperatura de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ . O tempo de imobilidade é medido no intervalo de 6 minutos de observação e os animais são considerados imóveis quando se mantém flutuando, com apenas os movimentos essenciais para manter a cabeça fora da água. Os controles positivo e negativo utilizados são imipramina (20 mg/Kg) e salina, respectivamente (Viana *et.al.*, 2003).

Outro teste muito utilizado para prever a atividade antidepressiva é o teste de suspensão pela cauda (TSC). Este teste foi introduzido há 27 anos com a intenção de investigar a atividade antidepressiva em camundongos (Steru *et.al.*, 1985). O TSC é baseado na observação de que roedores (como camundongos) desenvolvem uma postura de imobilidade frente à situação de estresse





























#### 4.12 Referências

- Abel, L.E. (1995). Circannual changes in the duration of the immobility response of rats in the forced swim test. *Physiology and Behavior*, v.58, pp.591-593.
- American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, quarta edição*, Washington.
- Ansorge, M.S.; Hen, R.; Gingrich, J.A. (2007). Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Current opinion in pharmacology*, v. 7, pp. 8-17.
- Barbier, E.; Wang, J. (2009). Anti-depressant and anxiolytic like behaviors in PKCI/HINT1 knockout mice associated with elevated plasma corticosterone level. *BMC Neuroscience*, v. 10, pp. 132-146.
- Bhattacharya, S., Chakrabarti, A., & Chatterjee, S. (1998). Activity profiles of two hyperforin containing Hypericum extracts in behavioral models. *Pharmacopsychiatry*, v.31, pp. 22-29.
- Bilici, M.; Efe, H.; Koroglu, M.A. (2001). Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *Journal of Affective Disorders*, v. 64, pp. 43-51.
- Berton, O.; Nestler, E.J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 7, pp.137-141.
- Bondy, B. (2002). Pathophysiology of depression and mechanisms of treatment. *Dialogues in Clinical Neurosciences*, v. 4, pp. 7-20.
- Bourin, M.; Hascoet, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, pp. 55-65.
- Butterweck, V.; Christoffel, V.; Nahrstedt, A.; Petereit, F.; Spengler, B.; Winterhoff, H. (2003). Step by step removal of hyperforin and hypericin: activity profile of different Hypericum preparations in behavioral models. *Life Sciences*, v. 73, pp. 627-639.
- Butterweck, V., Hegger, M., & Winterhoff, H. (2004). Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. *Planta Medica*, v.70, pp. 1008-1011.
- Cervo, L.; Rozio, M.; Elkalle-Soppo, C.B.; Guiso, G.; Morazzoni, P.; Caccia, S. (2002). Role of hyperforin in the antidepressant-like activity of Hypericum perforatum extracts. *Psychopharmacology*, v.164, pp.423-428.

Chatterjee, S., Bhattacharya, S., Wonnemann, M., Singer, A., & Muller, W. (1998b). Hyperforin as a possible antidepressant component of Hypericum extracts. *Life Sciences*, *v.63*, pp. 449-510.

Chatterjee, S., Noldner, M., Koch, E., & Erdelmeier, C. (1998). Antidepressant activity of Hypericum perforatum and hyperforin, the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry*, *v.31*, pp. 7-15.

Chopra, K. (2011). *Neurobiology of depression and Alzheimer's disease*. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG.

Clarcke, M., Prendergast, M., & Terry, A. J. (1999). Plasma membrane ordering agent pluronic F-68 (PF-68) reduce neurotransmitter uptake and release and produces learning and memory deficits in rats. *Learning & memory*, *v.6, n.6*, pp. 634-649.

Cooper, J.R.; Bloom, F.E.; Roth, R.H. (1996). *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*. 7 ed. New York: Oxford University Press, 518p.

Cryan, J., Mombereau, C., & Vassout, A. (2005). The tail suspension test as a mode for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. *Neuroscience and Behavioral Reviews*, *v. 29*, pp. 571-625.

Czeh, B.; Lucassen, P.J. (2007). What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, *v. 257*, pp. 250-260.

Daudt, R., Von Poser, G., Neves, G., & Rates, S. (2000). Screening for the antidepressant activity of some species of Hypericum from South Brazil. *Phytoterapy Research*, *v.15*, pp. 344-346.

de Kloet, E.R; Joels, M.; Holsboer, F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*, *v. 6*, pp. 463-475.

Di Matteo, V., Di Giovanni, G., Di Mascio, M., & Esposito, E. (2000). Effect of acute administration of Hypericum perforatum-CO<sub>2</sub> extract on dopamine and serotonin release in the rat central nervous system. *Pharmacopsychiatry*, *v.33*, pp. 14-18.

Duarte, F., Lach, G., Martins, P., Romeiro, G., & Lima, T. (2008). Evidence for the involvement of the monoaminergic system in the antidepressant-like action of two 4-amine derivatives of 10, 11-dihydro-5-HT-dibenzo[a,d]cycloheptane in

mice evaluated in the tail suspension test. *Progress in neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, pp. 368-374.

DSM-IV(2004).  
Fonte:[http://books.google.es/books?id=3SQrtpnHb9MC&printsec=frontcover&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](http://books.google.es/books?id=3SQrtpnHb9MC&printsec=frontcover&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false), acessado em setembro de 2012.

Eckert, G., & Muller, W. E. (2001). Effects of hyperforin on the fluidity of brain membranes. *Pharmacopsychiatry*, v.34, suppl 1, pp. 22-25.

Eckert, G., Keller, J., Jourdan, C., Karas, M., Volmer, D., Schubert-Zsilavecz, M. E., et al. (2004). Hyperforin modifies neuronal membrane properties in vivo. *Neuroscience Letters*, v.367, pp. 139-143.

Eren, I.; Nazroglu, M.; Demirdas, A.; Celik, O.; Uğuz, A.C.; Altunbaşak, A.; Ozmen, I.; Uz, E. (2007). Venlafaxine modulates depression-induced oxidative stress in brain and medulla of rat. *Neurochemical Research*, v. 32, pp. 497-505.

Esplugues, J.V. (2002). NO as a signalling molecule in the nervous systems. *British Journal of Pharmacology*, v. 135, pp. 1079-1095.

Fitzgerald, P.; O'Brien, S.M.; Scully, P. (2006). Cutaneous glucocorticoid receptor sensitivity and pro-inflammatory cytokine levels in antidepressant-resistant depression. *Psychological Medicine*, v. 36, pp. 37-43.

Franklin, M., Reed, A., & Murck, H. (2004). Sub-chronic treatment with an extract of *Hypericum perforatum* (St John's wort) significantly reduces cortisol and corticosterone in the rat brain. *European Neuropsychopharmacology*, v.14, pp. 7-10.

Frodl, T.; Schule, C.; Schmitt, G. (2007). Association of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with reduced hippocampal volumes in major depression. *Archives of General Psychiatry*, v. 64, pp. 410-416.

Gambarana, C.; Tolu, P.L.; Masi, F. (2001). A study of the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* on animal models. *Pharmacopsychiatry*, v.34, pp.42-44.

Gnerre, C., Von Poser, G., Ferraz, A., Viana, A., Testa, B., & Rates, S. (2001). Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, v.53, pp. 1273-1279.

Gobbi, M., Moia, M., Pirona, L., Morrizoni, P., & Mennini, T. (2001). In vitro binding studies with two *Hypericum perforatum* extracts—hyperforin, hypericin

and biapigenin—on 5-HT<sub>6</sub>, 5-HT<sub>7</sub>, GABA(A)/benzodiazepine, sigma, NPY-Y1/Y2 receptors and dopamine transporters. *Pharmacopsychiatry*, v.34 , pp. 45-48.

Hamilton, M. (1960). A Rating Scale for Depression. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v23, pp 56-62.

Jensen, A.; Hansen, S. E. (2001). Adhyperforin as contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. *Life Science*, v.68 , pp. 1593-1605.

Kaehler, S.; Sinner, C.; Chatterjee, S.; & Philippu, A. (1999). Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. *Neuroscience Letters*, v.262, n3 , pp. 199-202.

Kaster, M.P.; Ferreira, P.K.; Santos, A.R. (2005). Effects of potassium channel inhibitors in the forced swimming test: possible involvement of L-arginine-nitric oxide-soluble guanylate cyclase pathway. *Behavioural Brain Research*, v. 165, pp. 204-209.

Kiewert, C.; Buchholzer, M.; Hartmann, J.; Chatterjee, S.; & Klein, J. (2004). Stimulation of hippocampal acetylcholine release by hyperforin, a constituent of St. John's Wort. *Neuroscience Letters*, v.364, n.3 , pp. 195-198.

Kruskal, W.H.; Wallis, W.A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, v.47, pp. 583–621.

Kumar, V.; Sing, P.; Muruganandam, A.; Bhattacharya, S. (2000). Effect of Indian *Hypericum perforatum* L. on animal models of cognitive dysfunction. *Journal of Ethnopharmacology*, v.72 , pp. 119-128.

Lemke, T.; & Williams, D. (2008). *Foye's principles of medicinal chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 6th ed.

Longone, P.; Rupprecht, R.; Manieri, G.A. (2008). The complex roles of neurosteroids in depression and anxiety disorders. *Neurochemistry international*, v. 52, pp. 596-601.

McEwen, B.S. (2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological Review*, v. 87, pp. 873-904.

McLeod, T.M.; Lopez-Figueroa, A.L.; Lopez-Figueroa, M.O. (2001). Nitric oxide, stress, and depression. *Psychopharmacology Bulletin*, v. 35, pp. 24-41.

- Möller, H.J.; Bitter, I.; Bobbes, J.; Fountoulakis, K.; Höschl, k.; Kasper, S. (2012). Position statement of the European Psychiatric Association (EPA) on the value of antidepressants in the treatment of unipolar depression. *European Psychiatry*, v. 27, pp. 114–128.
- Müller, W., Singer, A., & Wonnemann, W. (2001). Hyperforin – Antidepressant Activity by a Novel Mechanism of Action. *Pharmacopsychiatry*, v. 34, s.1 , pp. S98-S102.
- Müller, W. (2003). St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacological Research*, v.47, pp. 101-109.
- Murck, H., Uhr, M., Schaffler, K., & Seibel, K. (2004). Effects of Hypericum extract (LI160) on the change of auditory evoked potentials by cortisol administration. *Neuropsychobiology*, v.50, pp. 128-133.
- Murphy, D.L.; Pickar, D.; Alterman, I.S. (1982). Methods for the Quantitative Assessment of Depressive and Manic Behavior. In: E. Burdock, A. Sudilovsky, S. Gershon (Eds.), *The Behavior of Psychiatric Patients: Quantitative Techniques for Evaluation*. New York: Marcel Dekker, pp. 355-392.
- Nör, C.; Albring, D.; Ferra, A.B.F.; Schripsema, J.; Pires, V.; Sonnet, P.; Guillaune, D.; von Poser, G.L. (2004). Phloroglucinol derivatives from four Hypericum species belonging to the trigynobrathys section. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.32, pp. 517-519.
- OMS - Organização Mundial da Saúde (2008). The global burden of disease: update 2004. Disponível em [http://www.who.int/topics/global\\_burden\\_of\\_disease/en/](http://www.who.int/topics/global_burden_of_disease/en/). Acessado em junho de 2012.
- Peng, C.H.; Chiou, S.H.; Chen, S.J. (2008). Neuroprotection by imipramine against lipopolysaccharide-induced apoptosis in hippocampus-derived neural stem cells mediated by activation of BDNF and the MAPK pathway. *European Neuropsychopharmacology*, v. 18, pp. 128-140.
- Pittenger, C.; Duman, R.S. (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology*, v. 33, pp. 88-109.
- Porcelli, S.; Drago, A.; Fabbri, C.; Gibbino, S.; Calati, R.; Serretti, A. (2011). Pharmacogenetics of antidepressants response. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v.36, pp. 87-113.

- Porsolt, R.D.; Anton, G.; Blavet, N.; Jalfre, M. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *European Journal of Pharmacology*, v. 47, pp. 379-391.
- Porsolt, R.; Lenegre, A. (1992). Behavioral models of depression. In: *Experimental Approaches to Anxiety and Depression*. Wiley, London, pp. 73-85.
- Porsolt, R.D. (2000). Animal models of depression: utility for transgenic research. *Review Neuroscience*, v. 11, pp. 53-58.
- Raison, C.L.; Capuron, L.; Miller, A.H. (2006). Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. *Trends in Immunology*, v. 27, pp. 24-31.
- Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M. A.; Stoeckli- Evans, H.; Thull, U.; Testa, B., *et. al.* (1994). An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry*, v.36, pp. 1381-1385.
- Rommelspacher, H., Siemanowitz, B., & Mannel, M. (2001). Acute and chronic actions of a dry methanolic extract of *Hypericum perforatum* and hyperforin-rich extract on dopaminergic and serotonergic neurons in rat nucleus accumbens. *Pharmacopsychiatry*, v.34, pp. 119-126.
- Schiepers, O.J.; Wichers, M.C.; Maes, M. (2005). Cytokines and major depression. *Progress in neuro-psychopharmacology biological psychiatry*, v. 29, pp. 201-217.
- Shirayama, Y.; Chen, A.C.H.; Nakagawa, S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *Journal of Neuroscience*, v. 22, pp. 3251-3261.
- Simmen, U., Bobirmac, I., & Schoeffer, P. (2003). Antagonist effect of pseudohypericin at CRF1 receptors. *European Journal Pharmacology*, v.5, pp. 251-256.
- Singer, M., Wonnemann, M., & Muller, W. (1999). Hyperforin, a major antidepressant constituent of St John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>. *Journal of Pharmacology Experimental Therapy*, v.290, pp. 1363-1368.
- Stein, A.C.; Stolz, E. D.; Muller, L.G.; Cargnin, S.; Centurião, F.B.; Viana, A.F.; Bardon, A.; von Poser, G.L.; RATES, S.M.K. (2010). Dimeric phloroglucinol derivatives from South American species of *Hypericum* and *Elaphoglossum*

present antidepressant-like activity in mice.. In: 5 *Simpósio Brasileiro de Química Medicinal, Ouro Preto*.

Stein, A.C.; Viana, A.F.; Müller, L.G.; Nunes, J.M.; Stolz, E.D.; Do Rego, J.C.; Costentin, J.; Von Poser, G.L.; Rates, S.M.K. (2012). Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. *Behavioural Brain Research*, v. 228, pp.66-73.

Steru, L., Chermat, R., Thierry, B., & Simon, P. (1985). The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology*, v. 85, pp. 367-370.

Thompson, C. (1989). Affective disorders. In: Thompson C. (Ed). *The Instruments of Psychiatric Research*. London, John Wiley & Sons Ltd., pp. 87-126.

Viana, A., Do Rego, J.-C., Von Poser, G., Ferraz, A., Heckler, A., Costentin, J., et al. (2005). The antidepressant like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham &Schltdl. (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. *Neuropharmacology*, v.49, n.7, pp. 1042-1052.

Viana, A., Rates, S., Naudin, B., Janin, F., Costentin, J., & Do Rego, J. (2008). Effects of acute or 3-day treatments of *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdt. (Guttiferae) extract or of two established antidepressants on basal and stress-induced increase in serum and brain corticosterone levels. *Journal of Psychopharmacology*, v.22, n.6, pp. 681-690.

Williams, J.B.W.; Link, M.J.; Rosenthal, N.E. and Terman, M. (1990). *Structured Interview Guide for the Hamilton Depression Rating Scale Seasonal Affective Disorders Version (SIGH-SAD)*. New York State Psychiatric Institute. New York.

Willner, P. (1990). Animal models of depression: an overview. *Pharmacology and Therapeutics*, v.45, pp. 425-455.

Yoshitake, T., Iizuka, R., Yoshitake, S., Weikop, P., Muller, W., Ögren, S., et al. (2004). *Hypericum perforatum* L. (St John's wort) preferentially increases extracellular dopamine levels in the rat prefrontal cortex. *British Journal of Pharmacology*, v.142, pp. 414-418.

Zanoli, P. (2004). Role of hyperforin in the pharmacological activities of St. John's Wort. *CNS Drugs Reviews*, v. 10, n.3, pp. 203-218.

## Capítulo 3



## 5 Capítulo 3: Avaliação do potencial terapêutico dos derivados de floroglucinol para a Doença de Alzheimer

### 5.1 Dados da OMS

A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia de alto impacto sócio-econômico correspondendo por 1,7% das mortes em países desenvolvidos. O número de pessoas que sofrem com demência foi estimado em 35,6 milhões, para o ano de 2010, e que em 20 anos este número dobrará (OMS, 2012). Em países desenvolvidos, a DA é a quinta maior causa de morte, o que corresponde a 168 mil mortes ao ano (OMS, 2012). Os cuidadores são, em sua maioria, familiares próximos ao paciente, o que causa grande impacto emocional e financeiro às famílias à medida que a doença progride, levando ao óbito (Martinez, 2009). Do aparecimento dos primeiros sintomas ao óbito, a progressão da doença é de 8,5 a 11 anos, sendo em média de 4 a 6 anos de vida (Alzheimer's Association, 2010). Os custos estimados com tratamento de DA no mundo estão em 315 bilhões de dólares (Alzheimer's Disease International, 2009). A estimativa do total de pacientes com a DA no mundo para o ano de 2050 é assustadora e estaria próxima aos oitenta milhões de pacientes (OMS, 2012). Ainda não se sabe ao certo quando a doença inicia, porque o paciente começa a ser investigado justamente quando os sintomas começam a aparecer, e neste momento a DA já está instalada e provocando todos os processos neurodegenerativos no cérebro do paciente. Porém, alguns autores (Martinez, 2009) propõe que este processo inicia de dez a vinte anos antes do primeiros sintomas. Esta teoria segue em estudo, porém seria um grande avanço descobrir o princípio da DA para frear o que pode se tornar a epidemia do século XXI (Martinez, 2009).

### 5.2 Patologia

A DA é uma enfermidade associada diretamente ao avanço da idade, com prevalência de 0,02% em pessoas na faixa de idade entre 30 e 59 anos, aumentando para 10,8% na faixa etária entre 80 e 89 anos (Martinez, 2009). Esta doença é um pouco mais prevalente em mulheres que em homens, sendo que isto

pode ser explicado pelo fato de que as mulheres possuem uma expectativa de vida maior, além de sofrerem com alterações hormonais ao longo da vida, principalmente após a menopausa, onde estão menos protegidas, já que os estrógenos são conhecidos como antioxidantes e podem evitar a morte neuronal (Martinez, 2009). Estudos recentes (Carrasquillo *et. al.*, 2009) demonstraram que uma possível mutação no cromossomo X pode determinar uma maior incidência da doença de Alzheimer. A mutação encontra-se no gene PCDH11X e foi demonstrado a partir da autópsia de pacientes pertencentes ao estudo, no qual mulheres que apresentavam a mutação em ambos cromossomos tinham 75% maior risco de desenvolver a enfermidade. Já as que apresentavam em apenas um cromossomo tinham 26% mais chances de desenvolver a doença, e os homens que apresentavam tal mutação apresentavam um risco 18% maior que o restante da população. As pessoas que apresentam boa capacidade cognitiva, que pode ser natural ou adquirida, através de atividades que lhes proporcionem um constante exercício cerebral, apresentam a doença mais tarde além de apresentarem menor número de lesões cerebrais características desta doença (Martinez, 2009).

Além disso, níveis altos de colesterol, traumatismos cerebrais, hipertensão, arteriosclerose, tabagismo, obesidade e diabetes também são fatores que podem contribuir para o aparecimento e a evolução da doença (Martinez, 2009).

A DA se manifesta de formas diferentes, dependendo do paciente. A pessoa começa com pequenas perdas de memória, se esquece onde colocou as chaves e objetos de valor, não recorda reunião ou consultas, esquece torneiras abertas, fogão acesso após utilizar e em muitos casos não lembra de pessoas que conheceu em um passado próximo (Martinez, 2009). Com o avanço da doença, o rendimento no trabalho já não é mais o mesmo, repete as mesmas perguntas, tem dificuldade em conversas habituais, não encontrando as palavras para expressar-se, começa a desorientar-se espacialmente e já não tem mais preocupação com seu aspecto físico, desleixando-se e conseqüentemente isolando-se da vida social. Com o agravamento da enfermidade, que começa a ser muito rápido, a pessoa

tem dificuldade para vestir-se e cuidar-se sozinha e muitas vezes já não controla mais suas necessidades fisiológicas, exigindo o uso de fraldas geriátricas, e já podem ter momentos nos quais não reconhecem seus próprios amigos ou familiares. No estágio final da enfermidade, o paciente já não caminha e não fala, suas necessidades fisiológicas já não tem mais controle algum e acabam falecendo de alguma outra doença oportunista devido à debilidade do seu organismo (Martinez, 2009).

Infelizmente, o diagnóstico é feito tardiamente, quando o paciente ou algum familiar começa a observar alguns sintomas clássicos da doença e procuram auxílio médico. Os dez sinais aos quais se deve estar atento são: perda de memória que afeta a capacidade no trabalho, dificuldade para desenvolver tarefas domésticas, problemas de linguagem, desorientação no tempo e no espaço, juízo diminuído, problemas com pensamento abstrato (diminuição da percepção da realidade), coisas colocadas em lugares equivocados, mudanças no humor e no comportamento, mudanças na personalidade, perda da iniciativa (Martinez, 2009). Muitas pessoas apresentam alguns destes sintomas, mas isso não quer dizer que tenha a doença de Alzheimer, pode ser meramente o estresse da vida cotidiana que afeta algumas habilidades por um determinado período. Por isso a família e os amigos são importantes na hora de observar e orientar a busca de um profissional médico para uma correta avaliação (Martinez, 2009).

Como foi dito antes, não se sabe o que desencadeia efetivamente a DA, mas existem diversas hipóteses que vêm sendo estudadas para tentar desvendar o processo neurodegenerativo com conseqüente morte de neurônios, principalmente no córtex cerebral.

### 5.2.1 Hipótese colinérgica

Esta era uma das hipóteses mais aceitas até pouco tempo e apesar do surgimento de outras, esta segue sendo muito estudada. Segundo esta hipótese, a origem da DA está na deficiência da acetilcolina, que possui uma função importante nos processos de memória e aprendizagem. A acetilcolina é sintetizada no interior do neurônio pela colina acetiltransferase, a partir da colina

(Francis *et.al.*, 1999). A acetilcolina sintetizada é armazenada nos neurônios pré-sinápticos em pequenas vesículas, e é liberada na fenda sináptica ao ocorrer o impulso nervoso, interagindo desta forma com receptores colinérgicos (nicotínicos e muscarínicos) do neurônio pós-sináptico. Os receptores muscarínicos M2, presentes na fenda pré-sináptica apresentam uma função de *feedback*, desativando o extravasamento de acetilcolina na fenda, quando a sua quantidade já está adequada (Francis *et.al.*, 1999). Além deste fator de retroalimentação, existe também uma enzima capaz de degradar a acetilcolina em excesso na fenda sináptica em colina e acetila, denominada acetilcolinesterase. A colina é captada pelo neurônio e o ciclo inicia-se novamente. Sabe-se que o cérebro dos pacientes Alzheimer apresenta deficiência de acetilcolina, porém acredita-se atualmente que esta seja uma consequência e não uma causa, já que a morte neuronal afeta num primeiro momento os neurônios colinérgicos, causando a deficiência de acetilcolina (Francis *et.al.*, 1999).

### 5.2.2 Hipótese amilóide

Outra teoria, mais recente, estuda o acúmulo da proteína beta-amilóide no cérebro, que se deposita fora dos neurônios, produzindo as placas senis que se formam quando ao redor deste peptídeo agregado se acumulam produtos de neurônios mortos (Martinez, 2009). A proteína precursora do amilóide é uma proteína transmembrana que em condições fisiológicas normais é processada pelas secretases alfa e gama ajudando a madurar os neurônios. Porém, com o avanço da idade ou quando ocorre algum tipo de patologia, essa proteína é processada por duas diferentes secretases beta e gama, gerando desta forma o peptídeo beta-amilóide (Villegas *et.al.*, 2007). Este peptídeo possui 40-42 aminoácidos e em condições normais é solúvel, atóxico e não possui função fisiológica conhecida até o momento. Entretanto, em condições de mudança de pH ou em interação com outras proteínas, este peptídeo sofre uma modificação na sua conformação à lâmina beta, fazendo com que se auto agregue, precipitando no interior do neurônio provocando efeitos neurotóxicos, com o aparecimento das placas senis (Villegas *et.al.*, 2007; Pac-Soo *et.al.*, 2011). Com

o avanço da idade, o aparecimento destas placas se faz mais frequente, sendo que em cérebros de pacientes com Alzheimer normalmente estão em maior quantidade (Martinez, 2009).

### 5.2.3 Hipótese da proteína tau

A proteína tau está associada a microtúbulos que em condições normais se associa à tubulina e estabiliza o cito-esqueleto neuronal. Esta união com a tubulina é controlada através de um equilíbrio dinâmico entre as proteínas quinases e fosfatases (Grimes e Jope, 2001). Na presença da patologia, este equilíbrio é quebrado, podendo ocorrer um aumento na atividade das quinases, levando à hiperfosforilação da proteína tau. Desta forma, a proteína tau perde a capacidade de ligar-se à tubulina, desestabilizando o esqueleto neuronal, formando auto-agregados proteicos denominados pares de filamentos helicoidais, principais componentes dos emaranhados neurofibrilares (Grimes e Jope, 2001). Ao isolar a quinase responsável pela hiperfosforilação da proteína tau *in vivo*, identificou-se a proteína glicogênio quinase (GSK-3 $\beta$ ), que se apresentava sobre expressada nos cérebros de pacientes de Alzheimer (Grimes e Jope, 2001). Esta é responsável pela hiperfosforilação de mais de 95% da proteína tau, está implicada na síntese do peptídeo beta amilóide e no aumento da sua neurotoxicidade, além de ter relação com processos de inflamação da microglia, de morte neuronal e de participação em processos de consolidação da memória a longo prazo denominado *long term potentiation* (LTP) (Martinez, 2009).

### 5.2.4 Hipótese viral

O Estudo de Lin e colaboradores demonstrou (Lin *et.al.*, 2002) que existe uma conexão entre o vírus causador de herpes labial (*herpes vírus simples- HSV-1*) e o aparecimento de placas de proteínas nos cérebros de pacientes de Alzheimer. Estes pesquisadores acreditam que o vírus entra no cérebro do paciente devido a alguma deficiência imunológica e estabelece uma infecção latente, ativada por fatores como estresse, supressão imunológica ou outro tipo de infecção.

### 5.2.5 Antioxidantes e antiinflamatórios

Os processos oxidativos e anti-oxidativos estão associados com a transferência de elétrons influenciando no estado redox das células dos organismos. A mudança do estado redox pode estimular ou inibir atividades de várias sinalizações de proteínas, resultando numa habilidade em mudar as vias de sinalização (Chopra, 2011). O estresse oxidativo está implicado na doença de Alzheimer devido a várias constatações como o aumento da peroxidação lipídica em áreas específicas do cérebro, condicionada a presença de presenilina em camundongos *knock-out* (Gu *et.al.*, 2008). Alguns estudos verificaram um aumento na atividade da catalase, da superóxido dismutase, da glutathione peroxidase e da glutathione reductase no hipocampo e na amígdala (Casado *et.al.*, 2008; Perrin *et.al.*, 1990). Pratico e colaboradores (2001) sugeriram que o estresse oxidativo causa a formação de radicais livres resultando em neurodegeneração e possível formação de placas no sistema nervoso central.

O componente neuroinflamatório da doença de Alzheimer é caracterizado por uma resposta local mediada por citocinas em fase aguda, ativação da cascata complementar e indução do sistema de enzima inflamatória como o induzido pela óxido nítrico sintase e a geração da cicloxigenase-2 (Tuppo e Arias, 2005; Akiyama *et.al.*, 2000). Muitas evidências sugerem que estes fatores podem contribuir à disfunção e morte celular, tanto isolados quanto em conjunto. As células da microglia representam o sistema imune nato do cérebro e por isso é a primeira linha de defesa quando atingido por uma infecção bacteriana, viral ou fúngica. Embora esta função seja importante, é claro que a ativação microglial pode também ocorrer por proteínas endógenas e contribuir de forma significativa ao dano neuronal (Cameron e Landreth, 2010). Além das microglias, os astrócitos e até mesmo os neurônios podem estar reagindo e contribuindo diretamente às mudanças neuroinflamatórias crônicas na doença de Alzheimer (Chopra, 2011).

As células da microglia vêm sendo associadas com certos tipos de placas amilóides indicando que o desenvolvimento das placas e o grau de reação

microglial estão diretamente correlacionados. As placas amilóides estimulam o fator nuclear kappa B via dependente que é requerido para a transcrição do gene de citocinas, microglias ativas e astrócitos reativos (De Giorgio *et.al.*, 2002). Os astrócitos participam da depuração e da degradação das  $\beta$ -amilóides, promovendo suporte trófico aos neurônios, e formando uma barreira protetora entre depósitos  $\beta$ -amilóides e os neurônios. A presença de um grande número de astrócitos associado a depósitos  $\beta$ -amilóides na doença de Alzheimer sugere que estas lesões geram moléculas quimiotáticas que mediam o recrutamento de astrócitos (Kiostrinaho *et. al.*, 2004). Tem sido demonstrado que os astrócitos ao longo do córtex entorinal (responsável pela memória) de pacientes de Alzheimer acumulam gradualmente material  $\beta$ -amilóide<sub>1-42</sub>, e que este acúmulo está diretamente relacionado com a extensão local da enfermidade (Kiostrinaho *et. al.*, 2004).

#### 5.2.6 Alzheimer e diabetes

A causa da doença de Alzheimer e a sua relação com a diabetes ainda é desconhecida, porém sabe-se que um nível alto de açúcar no sangue, ou de insulina, pode danificar o cérebro de várias maneiras. A diabetes aumenta o risco de doenças do coração e derrame cerebral causando danos nos vasos sanguíneos, que podem contribuir para o desenvolvimento da DA. Além disso, um alto nível de açúcar no sangue pode causar inflamação, danificando as células do cérebro, propiciando o desenvolvimento da doença de Alzheimer (Alzheimer's Association, 2010).

Durante as primeiras etapas da doença de Alzheimer foi constatado que os níveis de insulina no cérebro e a quantidade de receptores para este hormônio estão diminuídos (Martinez, 2009). Este fato fez com que alguns autores denominassem a doença de Alzheimer como diabetes tipo III (Martinez, 2009).

A prevenção da diabetes não garante que o paciente não venha a desenvolver a doença de Alzheimer, porém algumas mudanças no estilo de vida podem evitar a diabetes e diminuir os fatores de risco para a DA, como por exemplo, diminuir em pelo menos 5% o seu peso corporal, realizar exercícios

físicos durante 30 minutos diariamente e manter uma dieta alimentar baixa em gorduras, rica em frutas e verduras, além de evitar comidas rápidas (Alzheimer's Association, 2010).

### 5.2.7 Fatores genéticos

A doença de Alzheimer é causada em apenas 5% dos casos por fatores genéticos. Nos casos onde a doença apresenta-se precocemente, pode-se relacionar com os cromossomos 1, 14 e 21, onde os genes presentes nestes cromossomos codificam as proteínas presenilina 1 e 2, assim como a proteína precursora de amiloide (APP). A maioria das mutações nos genes destas proteínas aumenta a produção de  $\beta$ -amilóide (National Institute of Health, 2011; Alzheimer's Association, 2008). O gene que codifica a APP está situado no cromossomo 21, e isto foi correlacionado pela primeira vez ao analisar indivíduos com síndrome de Down (trissomia do 21) que apresentavam características clinico-patológicas da doença, após os 30 anos de idade (National Institute of Health, 2011; Alzheimer's Association, 2008). Porém, nem todos os portadores desta síndrome desenvolverão a doença de Alzheimer quando em idade avançada. Existe uma maior probabilidade de afetar estes indivíduos devido ao declínio precoce das funções cognitivas relacionadas com o envelhecimento, mas outros fatores de riscos também podem contribuir para o desenvolvimento ou não da doença (National Institute of Health, 2011; Alzheimer's Association, 2008).

Muitos estudos demonstraram, ao analisar diferentes famílias de enfermos de Alzheimer, que aqueles indivíduos que apresentam uma mutação no gene da APP (independente da parte onde se encontre) desenvolvem a doença de Alzheimer. Essas mutações são responsáveis por 2% do total de casos da doença do tipo familiar e aproximadamente de 5 a 20% da doença do tipo familiar precoce (National Institute of Health, 2011; Alzheimer's Association, 2008).

A mutação no cromossomo 17 também está implicado na etiologia da doença. Neste cromossomo encontra-se o gene da proteína Tau, principal constituinte dos emaranhados neurofibrilares. Esse gene produz um RNAm que

se processa em seis isoformas diferentes, diferenciando-se entre si pela presença ou ausência dos éxons 2, 3 e 10 (Martinez, 2009).

Nos casos onde a doença de Alzheimer se manifesta tardiamente, normalmente estão envolvidos os cromossomos 12 e 19. No cromossomo 19 encontra-se o alelo  $\epsilon 4$  da apolipoproteína E (ApoE), proteína sanguínea que ajuda a transportar o colesterol. O alelo ApoE- $\epsilon 4$  é responsável pelo aparecimento da doença em uma grande variedade de grupos étnicos (National Institute of Health, 2011; Alzheimer's Association, 2008). Nos caucasianos e japoneses, por exemplo, os indivíduos portadores de dois alelos  $\epsilon 4$  têm de 10 a 30 vezes mais riscos de sofrer da doença de Alzheimer aos 75 anos do que os que não possuem nenhum alelo. Não se conhece a causa pela qual o alelo  $\epsilon 4$  provoca a DA, porém existem evidências de que interage com o peptídeo amilóide, aumentando a sua produção. Entretanto, a detecção de  $\epsilon 4$  não é indicativo de que o indivíduo irá desenvolver a doença. A sua presença apenas indica que este indivíduo tem maiores riscos, com o avanço da idade (Martinez, 2009).

O cromossomo 12, também associado à doença de Alzheimer do tipo tardio, possui o gene receptor da lipoproteína de baixa densidade determinante no crescimento neurítico. Porém, os dados a respeito deste cromossomo ainda são bastante discutidos, e não possuem dados totalmente conclusivos (Martinez, 2009).

### 5.3 Diagnóstico

Atualmente, não existe um exame ou prova que diagnostique com certeza a doença de Alzheimer, porém são realizados testes de memória e de funcionalidade intelectual durante um determinado período de tempo, além da observação clínica do paciente. O diagnóstico após estas avaliações costumam ter um índice de acerto entre 85 e 90%, porém somente após a autópsia pode-se dizer com 100% de certeza que o paciente padecia da doença de Alzheimer (Martinez, 2009). Rotineiramente, os critérios utilizados para avaliar a condição do paciente seguem a quarta edição do manual diagnóstico e estatístico da Associação Americana de Psiquiatria (DSM-IV-TR-2004), bem como o material

do Instituto Nacional de doenças neurológicas, Alzheimer e AVC e doenças relacionadas (NINCDS-ADRDA). As avaliações neuropsicológicas são realizadas na forma de perguntas que podem ser respondidas nas modalidades oral e escrita, somando uma pontuação máxima de 30 pontos, onde pacientes normais atingem em média 27,5 pontos e os pacientes com demência 9,7 pontos. Além disso, também é feito um teste para medir a cognição do paciente e saber em que nível da doença apresenta-se. Os familiares próximos também são entrevistados, sendo a informação proporcionada por eles de grande valia para o diagnóstico (DSM-IV-TR-2004).

Além dos testes cognitivos, também pode-se empregar técnicas de imagem como a ressonância magnética nuclear, capaz de mostrar a atrofia tecidual em determinado local do cérebro. No princípio da enfermidade podem não aparecer estas diminuições, porém com o avanço da doença o córtex mostra-se diminuído (Martinez, 2009). A tomografia axial de pósitrons (PET) também é utilizada para auxiliar no diagnóstico e permite afirmar com 90% de certeza se a pessoa está ou não desenvolvendo a DA. Esta técnica avalia e quantifica *in vivo* os processos bioquímicos e fisiológicos ligados à disfunção cognitiva utilizando a flúor desoxiglicose (FDG), marcada com flúor 18. Através da PET pode-se avaliar se existe uma metabolização deficitária da glicose e em que região isto ocorre, chegando-se assim a uma maior clareza no diagnóstico de pacientes com suspeita da doença de Alzheimer, e que apresentam tal déficit (Martinez, 2009). Outra técnica utilizada é a tomografia computadorizada de fóton único (SPECT ou SPET), que permite a obtenção de imagens, na forma de cortes ou sessões, em qualquer plano espacial. A avaliação realizada dependerá do radiofármaco administrado, onde será analisada a perfusão no local, a concentração de neuroreceptores ou a atividade metabólica da lesão em questão (Martinez, 2009).

Juntamente com as análises fisiológicas e os testes cognitivos, estas técnicas são ferramentas fundamentais para um diagnóstico mais acertado. Porém, devido ao seu alto custo, principalmente a PET e a SPECT, não são utilizadas rotineiramente na avaliação da grande maioria dos pacientes. Por isso,

também se faz necessária a investigação de novas técnicas de detecção precoce da enfermidade, bem como a diminuição do custo destas técnicas já existentes (Martinez, 2009).

#### 5.4 Tratamentos atuais

Atualmente não existem tratamentos eficazes capazes de frearem a DA. Como o estudo intensivo desta doença começou na década de oitenta, existem apenas cinco fármacos capazes de paliar os efeitos cognitivos num intervalo de tempo de 12 a 24 meses, porém sem impedir que a neurodegeneração siga. Estes fármacos aumentam a quantidade de acetilcolina no espaço intersináptico, fazendo com que a sua cognição se mantenha estável por um determinado período de tempo, melhorando a sua qualidade de vida neste ínterim (Martinez, 2009). O primeiro fármaco com este mecanismo de ação aprovado foi a tacrina **161** (Figura 42), em 1993, porém seu uso atualmente está bastante restrito por casos descritos de hepatotoxicidade. Após, foram introduzidos no mercado outros três fármacos: donepezil **162**, rivastigmina **163** e galantamina **164** (Figura 42), sendo o primeiro, um inibidor reversível, o mais utilizado na terapêutica atual, por ser administrado apenas uma vez ao dia (Lemke e Williams, 2008).

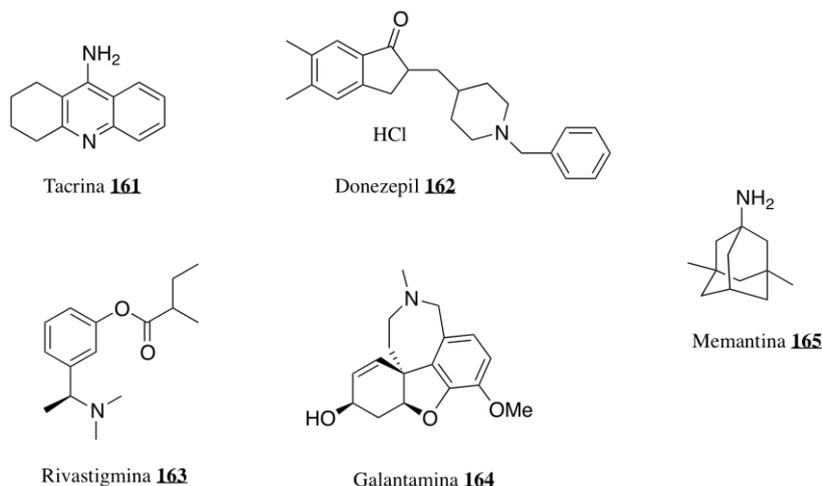


Figura 42: Estrutura dos compostos tacrina **161**, donepezil **162**, rivastigmina **163**, galantamina **164** e memantina **165**.

O último fármaco aprovado para tratamento da doença de Alzheimer foi a memantina **165** em 2002 (Figura 42), que possui um mecanismo de ação































































## 5.9 Referências

Akhtar, M.N.; Lam, K.W.; Abas, F.; Maulidiani; Ahmad, S.; Shah, S.A.A.; Attatur-Rahman; Choudhary, M.I.; Lajis, N.H. (2011). New class of acetylcholinesterase inhibitors from the stem bark of *Knema laurina* and their structural insights. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 21, pp. 4097–4103.

Akiyama, H.; Barger, S.; Barnum, S.; Bradt, B.; Bauer, J.; Cole, G.M.; Cooper, N.R.; Eikelenboom, P.; Emmerling, M.; Fiebich, B.L.; Finch, C.E.; Frautschy, S.; Griffin, W.S.; Hampel, H.; Hull, M.; Landreth, G.; Lue, L.; Mrak, R.; Mackenzie, I.R.; McGeer, P.L.; O'Banion, M.K.; Pachter, J.; Pasinetti, G.; Plata-Salaman, C.; Rogers, J.; Rydel, R.; Shen, Y.; Streit, W.; Strohmeyer, R.; Tooyoma, I.; Van Muiswinkel, F.L.; Veerhuis, R.; Walker, D.; Webster, S.; Wegrzyniak, B.; Wenk, G.; Wyss-Coray, T. (2000). Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, v. 21, pp. 383-421.

Alzheimer's Association (2008). Fonte: [http://alzheimers.org.uk/site/scripts/documents\\_info.php?documentID=168](http://alzheimers.org.uk/site/scripts/documents_info.php?documentID=168). Acessado em agosto de 2012.

Alzheimer's Association (2010). Fonte: <http://www.alz.org/>. Acessado em Agosto de 2012.

Alzheimer's Disease International. (2009). Fonte: <http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport-Portuguese.pdf>. Acessado em agosto de 2012.

Atila-Gokcumen, G.E.; Pagano, N.; Streu, C.; Maksimoska, J.; Filippakopoulos, P.; Knapp, S.; Meggers, E. (2008). Extremely tight binding of a ruthenium complex to glycogen synthase kinase 3. *Chembiochem*, v. 9, pp. 2933-2936.

Audus, K.L.; Ng, L.; Wang, W.; Borchardt, R.T. (1996) Brain microvessel endothelial

Baki, A.; Bielik, A.; Molnár, L.; Szendrei, G.; Keseru, G.M. (2007). A High Throughput Luminescent Assay for Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Inhibitors. *Assay and Drug Development Technologies*, v. 5, pp. 75-83.

Bertrand, J.A.; Thieffine, S.; Vulpetti, A.; Cristiani, C.; Valsasina, B.; Knapp, S.; Kalisz, H.M.; Flocco, M. (2003). Structural characterization of the GSK-3 $\beta$  active site using selective and non-selective ATP-mimetic inhibitors. *Journal of Molecular Biology*, v. 333, pp. 393-407.

BMG LABTECH Application note 148 (2006): ORAC Assay on the FLUOstar OPTIMA to Determine Antioxidant Capacity. <http://www.bmglabtech.com/application-notes/fluorescence-intensity/orac-148.cfm>

Cameron, B.; Landreth, G.E. (2010). Inflammation, microglia, and Alzheimer's disease. *Neurobiology Disease*, v. 37, pp.503–509.

Carrasquillo, M.M.; Zou, F.; Pankratz, V.S.; Wilcox, S.L.; Ma, L.; Walker, L.P.; Younki, S.G.; Younkin, C.S.; Younkin, L.H.; Biseglio, G.D.; Ertekin-Taner, N.; Crook, J.E.; Dickson, d.W.; Petersen, R.C.; Graff-Radford, N.R. (2009). Genetic variation in PCDH11X is associated with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, v. 41, pp. 192-198.

Casado, A.; Encarnación López-Fernández, M.; Casado M.C.; de La Torre, R. (2008). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in vascular and Alzheimer dementias. *Neurochemical Research*, v.33, pp.450-8.

Chopra, K. (2011). *Neurobiology of depression and Alzheimer's disease*. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co. KG.

De Giorgio, L.A.; Shimizu, Y.; Chun, H.S.; Cho, B.P.; Sugama, S.; Joh, T.H.; Volpe, B.T. (2002). APP knockout attenuates microglial activation and enhances neuron survival in substantia nigra compacta after axotomy. *Glia*, v. 38, pp.174-8.

Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. (2003). High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.38, pp. 223-232.

Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S.M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T.C.; Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, v. 105, pp.721-732.

DSMD-IV: American Psychiatric Association. (2008). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th edition, text revised. Washington, DC.

Ellman, G. L.; Courtney, D. K.; Andres, V.; Featherstone, R. M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, pp. 88-95.

Embi, N.; Ryllat, D.B.; Cohen, P. (1980). Glycogen synthase kinase-3 from rabbit skeletal muscle. Separation from cyclic-AMP-dependent protein kinase

and phosphorylase kinase. *European Journal of Biochemistry*, v.107, pp.519-527.

Fischer, H.; Gottschlich, R.; Seelig, A. (1998). Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion. *Journal of Membrane Biology*, v.165, pp. 201–211.

Francis, P.T.; Palmer, A.M.; Snape, M.; Wilcock, G.K. (1999). The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*, v. 66, pp. 137–147.

Gratton, J.A.; Abraham, M.H.; Bradbury, M.W.; Chadha, H.S.(1997) Molecular factors influencing drug transfer across the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacy Pharmacology*, v. 49, pp. 1211–1216.

Grimes, C.A.; Jope, R.S. (2001). The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cellular signaling. *Progress in Neurobiology*, v. 65, pp. 391-426.

Gu, F.; Zhu, M.; Shi, J.; Hu, Y.; Zhao, Z. (2008). Enhanced oxidative stress is an early event during development of Alzheimer-like pathologies in presenilin conditional knock-out mice. *Neuroscience Letters*, v. 440, pp.44-48.

Ishii, R.; Horie, M.; Saito, K.; Arisawa, M.; Kitanaka, S. (2001). Inhibitory effects of phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus* on nitric oxide production by a murine macrophage-like cell line, RAW 264.7, activated by lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$ . *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1568, pp. 74-82.

Jope, R.S. (2011). Glycogen synthase kinase-3 in the etiology and treatment of mood disorders. *Frontier in Molecular Neuroscience*, v. 4, pp. 1-11.

Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. (1998). Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, pp. 1007–1010.

Koistinaho, M.; Lin, S.; Wu, X.; Esterman, M.; Koger, D.; Hanson, J.; Higgs, R.; Liu, F.; Malkani, S.; Bales, K.R.; Paul, S.M. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nature Medicine*, v.10, pp.719-726.

Lemke, T.; & Williams, D. (2008). *Foye's principles of medicinal chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 6th ed.

Leroy, K.; Brion, J.P. (1999). Developmental expression and localization of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in rats brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, v. 16, pp. 279-293.

Levin, V.A. (1980). Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.23, pp. 682- 684.

Lin, W.R.; Wozniak, M.A.; Cooper, R.J.; Wilcock, G.K.; Itzhaki, R.F. (2002). Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *The Journal of Pathology*, v. 197, pp. 395-402.

Lineweaver, H.; Burck, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of American Chemical Society*, v. 56, pp. 658-666.

Logan, C.Y.; Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annal. Review off Cell and Developmental Biology*, v. 20, pp. 781–810.

Martinez, A.; Castro, A.; Dorronsoro, I.; Alonso, M. (2002). Glycogen Synthase Kinase 3(GSK-3) Inhibitors as New Promising Drugs for Diabetes, Neurodegeneration, Cancer, and Inflammation. *Medicinal Research Reviews*, V. 22, pp. 373-384.

Martinez, A. (2009) *¿Qué sabemos de? El Alzheimer*. Publicado por CSIC y Editora Catarata, Madrid.

Martinez, A.; Gil, C.; Perez, D.I. (2011). Glycogen Synthase Kinase 3 inhibitors in the next horizon for Alzheimer's Disease treatment. *International Journal of Alzheimer's Disease*, vol. 2011, Article ID 280502, 7 pages. doi:10.4061/2011/280502.

Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computacional Chemistry*, v. 30, pp. 2785-2791.

National Institute of Health. (2011). Fonte: <http://www.nia.nih.gov/alzheimers/publication/alzheimers-disease-genetics-fact-sheet>. Acessado em julho de 2012.

OMS. (2012). Fonte: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241564458_eng.pdf), acessado em julho, 2012.

- Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, pp. 4619-4626.
- Pac-Soo, C.; Lloyd, D.G.; Vizcaychipi, M.P.; Statins, D.M. (2011). The Role in the Treatment and Prevention of Alzheimer's Neurodegeneration. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 27, pp. 1–10.
- Palomo, V.; Soteras, I.; Perez, D.I.; Perez, C.; Gil, C.; Campillo, N.E.; Martinez, A. (2011). Exploring the binding sites of glycogen synthase kinase 3. Identification and characterization of allosteric modulation cavities. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 54, pp. 8461-8470.
- Pérez-Garrido, A.; Helguera, A.M.; Ruiz, J.M.M.; Rentero, P.Z. (2012). Topological sub-structural molecular design approach: radical scavenging activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, pp. 86-94.
- Perrin, R.; Briançon, S.; Jeandel, C.; Artur, Y.; Minn, A.; Penin, F.; Siest, G. (1990). Blood activity of Cu/Zn superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in Alzheimer's disease: a case-control study. *Gerontology*, 36, pp. 306-13.
- Platts, J.A.; Abraham, M.H.; Zhao, Y.H.; Hersey, A.; Ijaz, L.; Butina, D. (2001). Correlation and prediction of a large blood–brain distribution data set—an LFER study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 36, pp. 719-730.
- Praticò, D.; Uryu, K.; Leight, S.; Trojanoswki, J.Q.; Lee, V.M. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *Journal of Neurosciense*, v.21, pp.4183-7.
- Ramos, L.A.; Cavalheiro, C.C.S.; Cavalheiro, E.T.G. (2006). Determination of nitrite in water using a flower extract. *Química Nova*, v.29, pp. 1114-1120.
- Reichel, A.; Begley, D.J. (1998). Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharmaceutical Research*, v.15, pp.1270-1274.
- Seelig, A.; Gottschlich, R.; Devant, R.M. (1994). A method to determine the ability of drugs to diffuse through the blood-brain barrier. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.91, p. 68- 72.

ter Haar, E.; Coll, J.T.; Austen, D.A.; Hsiao, H.M.; Swenson, L.; Jain, J. (2001). Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. *Nature structural and molecular biology*, v. 8, pp. 593-596.

Tuppo, E.E.; Arias, H.R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 37, pp. 289-305.

Villegas, A.; Castañeda, M.M.; Arias, L.F.; Vieco, B.; Lopera, F.; Bedoya, G. (2007). Evaluación de la producción de b-amiloide por la mutación E280A en el gen de la presenilina 1. *Biomédica*, v.27, pp. 372-384.

Woo, Y.J.; Lee, B.H.; Yeun, G.H.; Kim, H.J.; Won, M.-H.; Kim, S.H.; Lee, B.H.; Park, J.H. (2011). Selective Butyrylcholinesterase Inhibitors Using Polyphenol-polyphenol Hybrid Molecules. *Bulletin of the Korean Chemistry Society*, V. 32, pp. 2593-2598.

Wooget, J.R. (1990). Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A. *The EMBO Journal*, v.9, pp. 2431-2438.

Word, J.M.; Lovell, S.C.; Richardson, J.S.; Richardson, D.C. (1999). Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation. *Journal of Molecular Biology*, v. 285, pp.1735-1747.

**Considerações Finais**



## 6 Considerações Finais

Os derivados do floroglucinol foram sintetizados neste trabalho a partir da simplificação estrutural. Esta ferramenta mostrou-se útil, visto que moléculas muito mais simples do que as descritas na literatura (como as uliginosinas) apresentaram atividade antidepressiva no teste de suspensão pela cauda, possibilitando o desenvolvimento e o planejamento de outros compostos de origem sintética. Este resultado vai proporcionar o estudo de compostos para os testes *in vivo* para tal atividade, já que em sua maioria eram extraídos de plantas, muitas vezes com baixos rendimentos e difícil purificação. O uso de microondas também mostrou-se uma interessante ferramenta na síntese de alguns compostos isoprenilados, bem como de alguns compostos acilados, gerando produtos com maiores rendimentos, em menor tempo e de forma mais seletiva. Os resultados obtidos no TSC são bastante promissores, tendo em vista que sete dos dez compostos testados foram ativos a uma dose mol/Kg quando comparado a dose de imipramina (20 mg/kg). Este *screening* inicial mostrou que moléculas estruturalmente mais simples que as uliginosinas também apresentam tal atividade. Apesar dos resultados positivos, se fazem necessários mais estudos sobre sua potência e a toxicidade destas moléculas, para que a partir delas se possa fazer um estudo racional na busca de um composto líder. Assim como na avaliação da atividade do tipo antidepressiva, a predição para doenças neurodegenerativas mostrou-se promissora. Atualmente muitos estudos vem demonstrando que pode existir uma correlação entre depressão e Alzheimer, embora ainda haja muita controvérsia no meio científico, esta hipótese deixa clara que a descoberta de novos compostos ativos para a depressão pode também trazer a chave para a cura ou inibição de doenças como o Alzheimer. A maioria dos compostos se mostrou seletivo para a inibição de acetilcolinesterase, quando comparados a butirilcolinesterase. No ensaio de inibição da enzima GSK-3 $\beta$  dois compostos apresentaram inibição considerada moderada para a enzima. Estes apresentaram comportamentos similares, não competindo com o ATP, e apresentando inibição mista em relação ao substrato GS2. Este mecanismo foi

investigado por modelagem molecular através de *docking*, porém não se pode concluir, pelos valores teóricos obtidos, nos quais os compostos interagem, além do sítio do substrato. O conjunto destes resultados permite um novo ponto de partida para o estudo da depressão e da doença de Alzheimer, pois não existe na literatura, para estes compostos, um estudo tão abrangente. Como neste trabalho apenas se iniciaram os estudos com estes derivados, muitos dados ainda precisam ser melhor estudados e complementados, porém a partir daqui o planejamento de novas moléculas já terá uma base mais sólida para seguir, no estudo destas atividades.



**U F R G S**  
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:** 20846

**Título:** Síntese de derivados do floroglucinol e avaliação das atividades antidepressiva e analgésica

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

GRACE GOSMANN - coordenador desde 01/04/2009  
STELA MARIS KUZE RATES - Colaborador desde 01/04/2009  
Mônica Oliveira Duarte - Aluno de Doutorado desde 01/04/2009  
SORAIA LUNARDELLI - Aluno de Graduação desde 01/04/2009  
CINTIA JANINE KIEKOW - Aluno de Graduação desde 01/03/2010  
Alice Fialho Viana - Pós-Doutorado desde 01/04/2011  
Eveline Dischkaln Stolz - Aluno de Doutorado desde 01/04/2011

***Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 06/06/2011 - Sala da Propesq do Prédio da Ex-Química, no Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos 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, Terça-Feira, 14 de Junho de 2011

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO  
Coordenador da comissão de ética

