

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

Avaliação da atividade anticonvulsivante dos extratos de *Blechnum  
brasiliense* Desv. e do ácido rosmarínico

MARCOS ANTONIO AFONSO

PORTO ALEGRE, 2018.



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

Avaliação da atividade anticonvulsivante dos extratos de *Blechnum brasiliense*  
Desv. e do ácido rosmarínico

Dissertação apresentada por Marcos  
Antonio Afonso para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr. Amélia Teresinha Henriques

Co-orientador: Prof. Dr. Diogo Losch de Oliveira

PORTO ALEGRE, 2018.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de março de 2018, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dra. Ana Paula Herrmann  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra. Renata Biegelmeyer da Silva Rambo  
Universidade Federal da Bahia

Afonso, Marcos Antonio

Avaliação da atividade anticonvulsivante dos extratos de *Elechnum brasiliense* Desv. e do ácido rosmarínico / Marcos Antonio Afonso. -- 2018.

135 f.

Orientadora: Amélia Teresinha Henriques.

Coorientador: Diogo Losch de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Anticonvulsivante. 2. *Blechnum*. 3. zebrafish. 4. Ácido Rosmarínico. 5. Ácido cainico. I. Henriques, Amélia Teresinha, orient. II. de Oliveira, Diogo Losch, coorient. III. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os estudos com o modelo animal de peixe-zebra, foram desenvolvidos no laboratório 24d do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.



“Provavelmente, pensa a morte, houve um tempo em que todos os seres vivos eram uma coisa só, mas depois, a pouco e pouco, com a especialização, acharam-se divididos em cinco reinos, a saber, as moneras, os protistas, os fungos, as plantas e os animais, em cujo interior, aos reinos nos referimos, infindas macroespecializações e microespecializações se sucederam ao longo das eras, não sendo portanto nada de estranhar que, em meio de tal confusão, de tal atropelo biológico, algumas particularidades de uns tivessem aparecido repetidas noutros.”

(As intermitências da morte, José Saramago).





## **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais e minha avó, pelo incentivo aos estudos e pelo apoio incondicional. Agradeço a minha namorada Lidiane da Silva Bonapaz pelo apoio em todos os momentos, pela paciência, incentivo, amor e carinho, meu muito obrigado.

Agradeço a minha orientadora Amélia T. Henriques, muito obrigado por todos os ensinamentos e pela confiança. Agradeço ao meu co-orientador Diogo L. Oliveira, pela confiança e por me oportunizar a trabalhar com o modelo experimental de peixe-zebra.

Agradeço em especial a Juliana M. Andrade Fasolo e ao Ben Hur Mussulini por todos os ensinamentos e pelas correções cuidadosas de resumos, artigo e da minha dissertação em todas as vezes que precisei e pelas dicas valiosas na parte de farmacognosia e neurociência, meu muito obrigado.

Sou grato a Mariana Koetz, Natally S. Toson e Suelen Baggio pela colaboração no trabalho, pelas risadas, conversas, ensinamentos e por não medirem esforços sempre que precisei, podem ter certeza que contribuíram significativamente para a minha formação pessoal e profissional.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Andressa Reis, Andressa Prestes, Angélica, Bruno, Caroline, Douglas, Elen, Henrique, Julia, Júlia Zanotto, Krissie, Leticia Danielli, Leticia, Marí, Maria, Melissa, Paula e Renata, pelas conversas, pelo precioso auxílio no projeto e principalmente pela amizade, meu muito obrigado.

Agradeço aos colegas do laboratório 24D da bioquímica, Suelen, Thaina, Luana, Emerson, Kami, Marcos Braga, Diego, Giovana, Luca, Professor Renato, Professor Eduardo Rico, muito obrigado por sempre estarem dispostos a me ajudar.



## RESUMO

A epilepsia é uma das desordens mais frequente do sistema nervoso central com aproximadamente 2% de prevalência mundial e 30% de refratariedade. O uso das plantas medicinais é uma possibilidade de identificar novas moléculas com potencial terapêutico. Nesse estudo, utilizamos o modelo de convulsão induzida pelo ácido caínico em *zebrafish* adulto, para explorar o potencial terapêutico da samambaia *Blechnum brasiliense* Desv. Primeiramente, utilizando cromatografia líquida de ultra eficiência, foi validado método analítico para quantificação do ácido rosmarínico na fração acetato de etila, obtida por fracionamento do extrato bruto da planta. A fração apresentou teor de 0,0764 g% de ácido rosmarínico. A partir desta fração foi realizado isolamento em coluna preparativa para obtenção do composto para testes em peixe-zebra. Nos ensaios toxicológicos em embriões de *zebrafish* foram avaliados o extrato bruto e a fração acetato de etila de *B. brasiliense*, bem como ácido rosmarínico isolado, possibilitando o cálculo das doses letais médias (DL<sub>50</sub>). Os valores foram 363,3 µg/mL para o extrato, 196,3 µg/mL para a fração e 250,3 µM para o ácido rosmarínico. Os resultados demonstraram que as amostras apresentaram toxicidade aos embriões apenas nas maiores concentrações testadas. Nos ensaios realizados com *zebrafish* adultos, todas as amostras foram capazes de modular o perfil e a intensidade da convulsão causada pelo ácido caínico, bem como a latência para a primeira crise clônica. As doses ativas foram: 20 mg/kg para o extrato bruto, 5 e 10 mg/kg para a fração acetato de etila e 1 mg/kg para o ácido rosmarínico, sendo capazes de reduzir as crises e aumentar o tempo de latência no modelo de epilepsia em *zebrafish*. Assim, nosso estudo indica a espécie *Blechnum brasiliense* como fonte de substância com potencial terapêutico a ser explorada para o tratamento da epilepsia.

**Palavras-chave:** Epilepsia; Ácido cainico; Peixe-zebra; *Blechnum brasiliense*; Ácido Rosmarínico



## ABSTRACT

Epilepsy is one of the most frequent disorders of the central nervous system with approximately 2% of world prevalence and 30% of refractoriness. The use of medicinal plants is a possibility to identify new molecules with therapeutic potential. In this study, we used the kainic acid-induced convulsion model in adult zebrafish to explore the therapeutic potential of the *Blechnum brasiliense* Desv fern. Firstly, using ultra-efficient liquid chromatography, we validated an analytical method for the quantification of rosmarinic acid in the ethyl acetate fraction, obtained by plant crude extract fractionation. The fraction presented a content of 0.0764 g% of rosmarinic acid. From this fraction was carried out the preparative column isolation of the compound for tests in zebrafish. In the toxicological tests using zebrafish embryos, were evaluated the crude extract and the ethyl acetate fraction of *B. brasiliense*, as well as, the isolated rosmarinic acid, allowing the calculation of median lethal doses (LD<sub>50</sub>). The values were 363.3 µg/mL for the extract, 196.3 µg/mL for the fraction and 250.3 µM for the rosmarinic acid. The results showed that samples presented toxicity to the embryos only in the highest concentrations tested. In the trials with adult zebrafish, all samples were able to modulate the profile and intensity of the convulsion caused by kainic acid, as well as, the latency for the first clonic crisis. The active doses were 20 mg/kg for the crude extract, 5 and 10 mg/kg for the ethyl acetate fraction, and 1 mg/kg for rosmarinic acid, being able to reduce the crises and increase the latency time in the zebrafish model of epilepsy. Thus, our study indicates the species *Blechnum brasiliense* as a source of substance with therapeutic potential to be explored for the treatment of epilepsy.

**Key-words:** Epilepsy; Kainic Acid; Zebrafish; *Blechnum brasiliense*; Rosmarinic acid.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - <i>Blechnum brasiliense</i> Desv .....	36
<b>Figura 2</b> - Cromatograma do extrato bruto de <i>B. brasiliense</i> , no comprimento de onda de 320 nm.....	36
<b>Figura 3</b> - Estrutura molecular do ácido rosmarínico.....	37
<b>Figura 4</b> - Fórmula estrutural do ácido caínico.....	42
<b>Figura 5</b> - Cromatograma obtido para a solução-amostra, segundo método desenvolvido por CLUE. Pico em 11,55 minutos corresponde ao ácido rosmarínico .....	50
<b>Figura 6</b> - Comatogramas das soluções (A) amostra; (B) SQR – CLUE .....	51
<b>Figura 6.1</b> - Comatogramas das soluções (A) Amostra; (B) Amostra +SQR – CLUE.....	51
<b>Figura 7</b> - Gráfico da média de linearidade do ácido rosmarínico.....	53





## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Parâmetros desenvolvidos para análise por CLUE.....	47
<b>Tabela 2</b> - Parâmetros avaliados na etapa de robustez – CLUE.....	49
<b>Tabela 3</b> - Dados obtidos a partir da média das áreas dos dias 1, 2 e 3 da linearidade – CLUE.....	52
<b>Tabela 3.1</b> - Análise de variância (ANOVA) para os dados de linearidade da curva padrão do ácido rosmarínico – CLUE.....	52
<b>Tabela 4</b> - Resultados para teor de ácido rosmarínico na etapa de precisão – CLUE.....	54
<b>Tabela 5</b> - Resultados obtidos na etapa de exatidão – CLUE.....	55
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos na etapa de robustez – CLUE.....	55



## LISTA DE ABREVIATURAS

AR - Ácido rosmarínico

AVC - Acidente vascular cerebral

COMT - Catecol O-metiltransferase

DL50 - Dose letal média

ELT - Epilepsia do lobo temporal

MAO - Monoamina oxidase

PTZ - Pentilenotetrazol

SNC - Sistema nervoso central

VGB - Vigabatrina



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	23
2. OBJETIVOS .....	29
2.1. Objetivo Geral .....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	33
3.1. Samambaias e o Gênero <i>Blechnum</i> L. ....	35
3.2. Ácido Rosmarínico (C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>8</sub> ).....	37
3.3. Epilepsia.....	38
3.4. Peixe-zebra .....	40
3.5. Peixe-zebra como Modelo de Epilepsia.....	40
3.6. Ácido Caínico como Modelo Indutor de Epilepsia.....	41
4. PARTE I: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DA FRAÇÃO DE <i>Blechnum brasiliense</i> .....	45
4.1. Metodologia .....	47
4.2 Resultados e Discussão .....	50
5. PARTE II: MANUSCRITO .....	57
6. DISCUSSÃO GERAL.....	84
7. CONCLUSÃO GERAL.....	92
8. REFERÊNCIAS .....	96
9. ANEXOS .....	114



## 1. INTRODUÇÃO

---

---





O uso de plantas medicinais na busca de tratamento, cura ou prevenção de doenças é de registro milenar, a qual é uma das práticas mais antigas da humanidade (Motta et al., 2013). As plantas são importantes fontes de compostos ativos de ampla diversidade estrutural e consequente importância farmacêutica, seja como medicamentos fitoterápicos ou fracionamento para produção de novos fármacos. Apesar do aumento do uso de medicamentos sintéticos, o emprego de plantas medicinais continua difundido em diversos países, como remédios caseiros ou fitoterápicos (Santos et al., 2011; Dutra et al., 2016).

O emprego das plantas pode se dar por diversos motivos entre eles econômicos, ou aplicabilidade como medicina alternativa. Associada a essa realidade, tem-se a grande biodiversidade da flora brasileira, representando uma importante fonte de matéria-prima para a indústria de medicamentos (Dutra et al., 2016). Dentre as espécies que compõem essa rica flora, encontram-se as pertencentes ao gênero *Blechnum* L., foco desta dissertação, apresentando poucos estudos na literatura.

São descritas aproximadamente 200 espécies pertencentes ao gênero *Blechnum*, em torno de 50 destas encontram-se nas Américas (Prado e Sylvestre 2013). As espécies de *Blechnum* L. são plantas herbáceas, podendo apresentar poucos centímetros de altura até 3 metros de cáudice. São vegetais que apresentam grande potencial ornamental amplamente distribuídos no estado do Rio Grande do Sul (Goetz et al., 2012).

É relatado o uso destas plantas na medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias e pulmonares, infecções urinárias e complicações hepáticas. Estudos com extrato de folhas de *B. occidentale* apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (Nonato, et al., 2009). Já para *B. orientale* são descritas atividade antioxidante, anticâncer e antibacteriana (Lai et al., 2010). Já os extratos e frações de *B. brasiliense* e *B. binervatum* destas plantas foram capazes de atuar sobre às enzimas monoamina oxidase (MAO) e catecol O-metiltransferase (COMT), além de reduzir marcadores de estresse oxidativo associados ao desencadeamento de doenças neurodegenerativas (Andrade, 2015). As análises químicas das espécies apontaram ácidos

hidroxicinâmicos como produtos majoritários, destacando-se os ácidos clorogênico e rosmarínico.

O ácido rosmarínico (ácido O-cafeoil-3,4-diidroxifenil láctico) é um composto hidroxilado isolado de fontes naturais, sendo um éster de ácido caféico e de ácido 3,4- diidroxifenil láctico. Primeiramente foi isolado da espécie *Rosmarinus officinalis*, e atualmente é relatado em ampla variedade de plantas de diversas famílias botânicas, apresentando atividades biológicas, inclusive no sistema nervoso central (SNC), como por exemplo, atividade neuroprotetora *in vivo* (Del Ré e Jorge, 2012, Khamse, et al., 2015). A busca por novos compostos neuroprotetores é foco constante de prospecção de biomoléculas (Geldenhuis; Van Der Schyf, 2013).

Uma das mais frequentes desordens que afeta o SNC é a epilepsia, caracterizada por crises epiléticas recorrentes e espontâneas, com exacerbada atividade do SNC, sendo esta de forma focal e delimitada, ou generalizada, afetando ambos hemisférios (Shorvon, 2011; Mussulini, 2017). Uma vez que 60% dos pacientes não possuem etiologia conhecida e que 30% são acometidos de crises epiléticas refratárias, a busca de novos fármacos é uma constante necessidade (Xiao *et al.*, 2015).

Decorrente dessa necessidade, novos modelos para avaliação de crises epiléticas emergiram na última década, entre eles destaca-se o *zebrafish* (Crawford et al., 2008). O *Danio rerio*, popularmente conhecido como *zebrafish* ou peixe-zebra, é um peixe de pequeno porte, facilmente adaptado a condições laboratoriais, com baixo custo de manutenção e alta fecundidade. Apresenta genoma mapeado com 70% de homologia ao material genético humano (Howe et al., 2013), alta similaridade fisiológica e anatômica, assim como uma barreira hemato-encefálica altamente conservada, ao comparar com os mamíferos (Eliceiri et al., 2011). Além disso, mapeamentos comportamentais destacam alta complexidade, podendo desempenhar tarefas cognitivas similares a roedores (Puty et al., 2014; Jones et al., 2015).

Além destes aspectos comportamentais, o *zebrafish* vem se destacando como um bom modelo para estudos de distúrbios do SNC, entre eles a epilepsia (Newman et al., 2014, Mussulini, et al. 2016). A descoberta do

mecanismo de ação de novas drogas ou a potencial inovação tecnológica na obtenção de fármacos, entre eles moléculas isoladas de origem vegetal, dependem de testes biológicos. O *zebrafish* reúne características relevantes por atender o critério dos 3Rs (*replacement, refinement, reduction*), além de possibilitar a diminuição significativa da quantidade de compostos a serem testados, visto que estes podem ser administrados intraperitonealmente em pequeno volume (Rosemberg et al., 2011 Gheno, Rosemberg e Souza 2015). Apresenta assim, características que o tornam um excelente modelo animal para varreduras de potenciais moléculas terapêuticas (Kalueff et al., 2014).



## **2. OBJETIVOS**

---

---



## 2.1. Objetivo Geral

Validar metodologia analítica por cromatografia de ultra-eficiência para quantificação de ácido rosmarínico na fração acetato de etila de *Blechnum brasiliense*. Além disso, o trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos toxicológicos em embriões de *zebrafish* e potencial anticonvulsivo em peixes adultos do extrato bruto, da fração acetato de etila de *B. brasiliense* e do ácido rosmarínico isolado, utilizando modelo de crises epilépticas induzidas por ácido caínico.

## 2.2. Objetivos Específicos

- Obter os extratos e frações de *Blechnum brasiliense*;
- Isolar o ácido rosmarínico a partir da fração acetato de etila da espécie;
- Validar método analítico para determinar o teor de ácido rosmarínico na fração acetato de etila da planta;
- Avaliar a toxicidade do extrato bruto e fração acetato de etila, bem como do ácido rosmarínico isolado em modelo utilizando embriões de *zebrafish*, para determinação da dose letal média (DL<sub>50</sub>) das amostras;
- Avaliar os efeitos do pré-tratamento agudo do extrato, da fração e do ácido rosmarínico sobre a indução de crises epilépticas pela administração de ácido caínico em *zebrafish* adulto.





### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

---

---



### 3.1. Samambaias e o Gênero *Blechnum* L.

As samambaias e licófitas pertencem ao grupo das Pteridófitas. O grupo apresenta-se amplamente distribuído pelo mundo, com vasta diversidade e riqueza de espécies (13600 aproximadamente), tendo como habitat regiões de clima tropical (Moran, 2008; Nunes, Michelon e Imig, 2016).

Estudos de filogenia demonstraram que esse grupo de vegetais apresentam duas linhagens evolutivas monofiléticas, não proximamente relacionadas (Pryer et al. 2001; Prado e Sylvestre, 2016). Sendo assim, o termo pteridófitas, está em desuso para definir as samambais e licófitas conjuntamente (Rothfels et al. 2012, Prado e Sylvestre, 2016). Apenas no Brasil são catalogadas 1329 espécies de samambaias das quais 30 espécies são do gênero *Blechnum* L. (Prado, et al., 2015; Flora do Brasil 2020, 2016).

O gênero *Blechnum* L. é composto por aproximadamente 200 espécies, sendo amplamente distribuídas pelo mundo. Nas Américas estima-se no mínimo 50 espécies (Chambers e Farrant, 2001, Dittrich, 2005, Prado e Sylvestre 2013). Seu nome vem do grego *blechnon*, um termo designado para definir samambaias de forma geral (Proctor, 1989). Os representantes deste gênero são plantas herbáceas, algumas de poucos centímetros de altura até plantas com cáudice de 3 metros de altura. (Tryon e Tryon, 1982, Dittrich et al. 2007). São plantas com grande potencial ornamental e amplamente distribuídas pelo estado do Rio Grande do Sul (Franz e Schmitt, 2005, Goetz et al., 2012).

Estudos científicos relatam efeito anti-inflamatório e antinociceptivo para os extratos de folhas de *Blechnum occidentale*, confirmando seu emprego na medicina popular, na qual é relatado o uso da planta no tratamento de doenças inflamatórias e pulmonares, infecções urinárias e complicações hepáticas (Barros e Andrade, 1997, Nonato, et al., 2009). Já para *B. orientale* são relatadas atividades antioxidantes, anticâncer e antibacteriana (Lai et al., 2010).

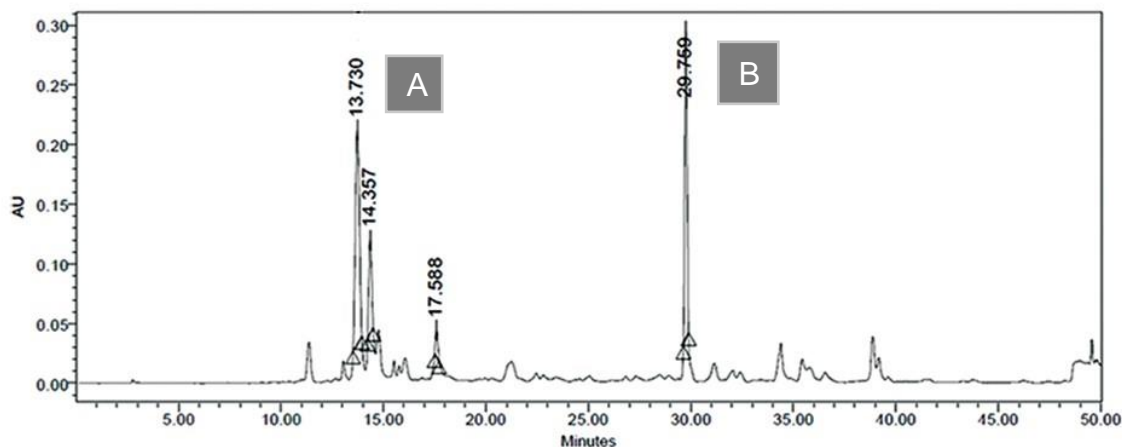
Estudos recentes realizados por Andrade (2015) com espécies de samambaias indicaram que extratos e frações de plantas do gênero *Blechnum* L., especialmente *B. brasiliense* (Figura 1), foram capazes de atuar sobre a enzima monoamina oxidase (MAO) e no combate ao estresse oxidativo. Esta

última propriedade é importante na prevenção de danos às estruturas celulares (Kanada et al., 2005).



**Figura 1** – *Blechnum brasiliense* Desv.

A análise química das espécies *Blechnum brasiliense* e *B. binervatum* mostrou ácidos hidroxicinâmicos como produtos majoritários, destacando-se os derivados de ácidos clorogênico e ácido rosmarínico (Figura 2).

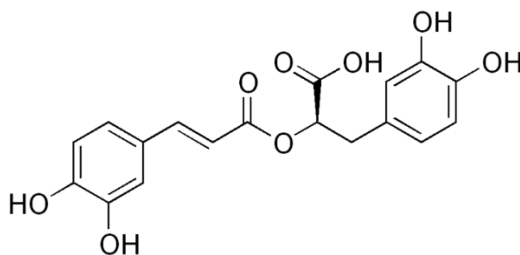


**Figura 2** – Cromatograma do extrato bruto de *B. brasiliense*, no comprimento de onda de 320 nm. (A) Picos relativos aos ácidos clorogênicos (13,7; 14,3 e 17,5 minutos); B) Pico do ácido rosmarínico em 29,7 minutos (Andrade, 2015).

O ácido rosmarínico isolado de *Blechnum brasiliense* demonstrou atividade inibitória frente às enzimas MAO e catecol O-metiltransferase (COMT) *in vitro* e *in silico*, além de influência sobre parâmetros de estresse oxidativo associados ao desencadeamento de doenças neurodegenerativas. Ainda, tanto extratos quanto o produto isolado demonstraram ausência de efeitos tóxicos a células de roedores e células-tronco humanas (Andrade, 2015).

### 3.2. Ácido Rosmarínico (C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>8</sub>)

O ácido rosmarínico (Figura 3) é um éster dos ácidos caféico e 3,4-dihidroxifenilático, encontrado como um metabólico secundário em várias espécies vegetais, incluindo samambaias (Petersen e Simmonds, 2003).



**Figura 3** – Estrutura molecular do ácido rosmarínico.

O composto apresenta inúmeras atividades biológicas, e ampla aplicação industrial como conservante alimentício e na indústria de cosméticos (Peterson e Simmonds, 2003). Estudos demonstraram que o ácido rosmarínico possui atividade antiviral (Swarup et al., 2007), incluindo ação contra o vírus da imunodeficiência humana tipo1 (Hooker et al., 2001, Dubois et al., 2008), antibacteriana (Salin, et al., 2011; Maskovic et al., 2011), antioxidante (Kosar et al., 2008; Del Ré e Jorge, 2012), anti-inflamatória (Osakabe et al., 2004), anticarcinogênica (Huang e Zheng, 2006; Lee et al., 2007), propriedade antiamnésica (Ren et al., 2009, Wang et al., 2012) e antialérgica (Makino et al., 2001; Sanbongi et al., 2004; Costa et al, 2012). Esta substância possui também uma importante atividade antiproliferativa (Huang e Zheng, 2006, Zhang et al., 2011, Wang et al., 2012). Além disso, o composto é bem absorvido pelo trato gastrointestinal e pela pele, sendo rapidamente eliminado da circulação

sanguínea após a administração intravenosa. Apresenta baixa toxicidade em camundongos, com Dose Letal Média (DL<sub>50</sub>) de 561 mg/kg (Zhang et al., 2011).

O estresse oxidativo desencadeado por excesso de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio é um dos fatores primários na etiologia de diversas doenças e desordens que afetam o SNC. Portanto, o ácido rosmarínico, por ser um antioxidante natural, pode ser benéfico no tratamento de doenças que afetam o SNC (Oksman-Caldentey e Inzé, 2004, Qiao et al., 2005).

### **3.3. Epilepsia**

A epilepsia é uma desordem do SNC, que se caracteriza por descargas neuronais excessivas e hipersincrônicas espontâneas e recorrentes (Shiha et al., 2014; Wang et al., 2016). As crises epilépticas podem estar associadas a uma variedade de sintomas, como alterações da consciência, movimentos e sensações (Chindo et al., 2014). Os mecanismos envolvidos no SNC afetado pela desordem epiléptica ainda não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que há um desequilíbrio entre os principais sistemas de neurotransmissão excitatório (glutamatérgico) e inibitório (gabaérgico) (Eyo et al., 2016).

A epilepsia é uma das desordens do SNC mais comuns e sua prevalência é de aproximadamente 2% (Shiha et al., 2014; S'wiader et al., 2016), afeta pelo menos 70 milhões de pessoas em todo o mundo (Sucher E Carle, 2015) e 3 milhões de brasileiros (LBE, 2016; OMS, 2016).

De acordo com os sintomas, a epilepsia pode ser classificada em três categorias principais: idiopática, adquirida e criptogênica. Sendo a idiopática uma crise sem lesão cerebral subjacente ou sem sinais e sintomas neurológicos, a qual acredita-se ser de origem genética ou com início na infância. Já na adquirida, os pacientes apresentam crises provenientes de uma ou mais lesões estruturais no cérebro, por exemplo, tumor, acidente vascular cerebral (AVC), etc. A criptogênica refere-se à epilepsia sintomática, mas sem etiologia estabelecida. Entre os casos descritos, aproximadamente 40% dos pacientes possuem etiologia conhecida, sendo as mais comuns: lesão cerebral,

traumas, acidente vascular cerebral isquêmico, hemorragia intracerebral, infecções no SNC, tumores e convulsões prolongadas associadas a febre (Löscher e Brandt, 2010; Yow et al., 2013).

As crises epiléticas são majoritariamente divididas em duas categorias principais: crises parciais ou generalizadas, simples (sem perda da consciência) ou complexas (com alteração da consciência) (Reddy e Kuruba, 2013; Mussulini, et al., 2016). Crises parciais são aquelas em que a despolarização ocorre localmente em um dos hemisférios e as lesões cerebrais são focais. A epilepsia parcial mais frequentemente encontrada é a epilepsia do lobo temporal (ELT) que atinge pelo menos 20% dos pacientes epiléticos e é considerada a mais refratária dentre as existentes (Reddy e Kuruba, 2013).

Crises generalizadas atingem globalmente o SNC, causando lesões em ambos os hemisférios, e o paciente apresenta perda de consciência imediata. Existem vários tipos de crises generalizadas, sendo que as mais importantes são as tônico-clônicas (antigamente denominadas de “grande mal”), as quais apresentam contração tônica e/ou clônicas da musculatura corporal; e as crises de ausência (“pequeno mal”) nas quais a pessoa perde a consciência por alguns segundos, podendo retomar o que estava fazendo em seguida (Mussulini, et al., 2016).

Muitos fármacos estão disponíveis para o tratamento da epilepsia, porém 30% dos pacientes são refratários aos tratamentos disponíveis (Vries et al., 2016). Atualmente os principais fármacos no tratamento da epilepsia são o valproato de sódio, lamotrigina, fenitoína, carbamazepina, topiramato, primidona e fenobarbital. Um agravante relacionado ao uso de medicamentos antiepiléticos são os efeitos adversos provocados durante o tratamento, como: sedação, depressão, comportamento aberrante, irritabilidade, impulsividade, raiva, hostilidade e agressão (Brodie et al., 2016). Com isso a busca de um melhor tratamento e melhor compreensão da epilepsia, se tornam necessárias e podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e com menos efeitos adversos (Vries et al., 2016).

### **3.4. Peixe-zebra**

O peixe-zebra ou *zebrafish* (*Danio rerio*) é um teleósteo, ovíparo, nativo dos arredores do leste da Índia (Axelrod & Schultz, 1955). Essa espécie além de ser muito utilizada por aquaristas no mundo inteiro, também é utilizada como modelo animal experimental (Liao et al., 2011). O *zebrafish* atinge sua maturidade sexual por volta de 3 meses, podendo a partir disso, desovar a cada 2-3 dias, centenas de oócitos (Lawrence, 2007).

Apresenta outras características vantajosas como: embrião transparente, o que permite a visualização da formação dos tecidos; rápido desenvolvimento e relativo curto ciclo de vida, possibilitando a aquisição de várias gerações durante o ano; fácil manejo e reprodução, reduzindo custo de manutenção e susceptibilidade a mutagênese, possibilitando a realização de estudos genéticos. Essas características facilitam a realização de testes toxicológicos, por ser possível a visualização do embrião no ovo e sua formação (Esch et al., 2012).

Já foi descrita homologia genética de mais de 70% entre humanos e peixe-zebra, apresentando 12.719 genes em comum (Howe, et al., 2013). Isso torna possível o estudo de doenças e fenômenos de forma extremamente controlada, com resultados científicos detalhados e relevantes. Essas características possibilitaram a realização de diversos estudos nas últimas décadas, sendo a primeira pesquisa realizada na década de 70 (Tobia, et al., 2013). A partir de então o *zebrafish* apresentou expansão como modelo animal, sendo valiosa ferramenta para estudos de diversas doenças e desordens, incluindo as relacionadas ao SNC, como a epilepsia (Mathur, et al., 2010; Tran e Gerlai, 2014; Li, et al., 2015).

### **3.5. Peixe-zebra como Modelo de Epilepsia**

O estudo de Granato e colaboradores (1996) foi o primeiro a relacionar comportamentos similares a crises epiléticas e mutações genéticas em *zebrafish*. O estudo identificou déficits motores e revelou uma série de



mutações em genes relacionados à epilepsia (Muto, et al., 2005). Este trabalho abriu as portas para outros estudos relacionados com o tema, com modelos de crises epilépticas genéticas e não-genéticas (Mussulini, et al., 2016).

Os modelos não-genéticos de crises epilépticas, tem demonstrado ao longo dos anos, um importante papel no desenvolvimento de fármacos antiepilépticos (Mussulini, et al., 2016). Esses modelos geralmente concentram-se em desequilibrar os sistemas neurotransmissores excitadores e inibitórios, ou seja, aumentam a atividade da neurotransmissão glutamatérgica (Zhou e Danbolt, 2014), ou diminuem a neurotransmissão gabaérgica (Schousboe, et al., 2014).

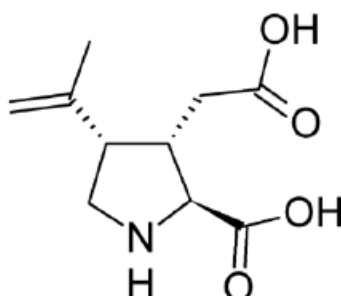
Dentre os modelos não-genéticos atuais, o modelo pentilenotetrazol (PTZ), foi o primeiro descrito para *zebrafish* (Baraban, et al., 2005). Recentemente já são descritos outros modelos, como: ácido domoico (Tiedeken e Ramsdell, 2007), pilocarpina (Vermoesen, et al., 2011), hipertermia (Hunt, et al., 2012) e ácido caínico (Alfaro, et al., 2011).

### **3.6. Ácido Caínico como Modelo Indutor de Epilepsia**

O ácido caínico (Figura 4) é um análogo cíclico do L-glutamato e um agonista dos receptores ionotrópicos de cainato (Alfaro, et al., 2011). Descoberto em 1950, o ácido caínico foi extraído a partir de uma espécie de alga vermelha (*Digenea simplex*), encontrada em águas tropicais e subtropicais (Lévesquea et al., 2013). Estudos indicaram que o ácido caínico induzia respostas excitatórias prolongadas em neurônios corticais, evidenciando que o ácido caínico podia induzir despolarizações e eventualmente morte celular, fenômeno também observado na epilepsia do lobo temporal (Lévesquea et al., 2013).

A partir dessas semelhanças foi proposto que as crises epilépticas induzidas pelo ácido caínico e a apoptose neuronal estão ligadas à liberação patológica do glutamato (Alfaro, et al., 2011). Por essas semelhanças comportamentais e patológicas, o ácido caínico tem sido amplamente utilizado

experimentalmente como indutor de crises epilépticas do lobo temporal, sendo o tipo mais comum de epilepsia refratária (Kao-Chang Lin *et al*, 2013).



**Figura 4** - Fórmula estrutural do ácido caínico.

Na experimentação animal, o ácido caínico pode ser injetado intraperitalmente, ou via sistêmica, o que vem sendo uma vantagem em relação à via de administração por injeção intracerebral, pois possibilita tratar mais de um animal ao mesmo tempo, além de não necessitar procedimentos cirúrgicos (Lévesquea *et al.*, 2013). O ácido caínico é um modelo de indução de crises epilépticas já bem estabelecido em roedores e conhecido por atuar através da super-estimulação do sistema excitatório (Quintans Júnior *et al.*, 2007). Porém em *zebrafish* o primeiro estudo com esse modelo foi realizado em 2011 (Alfaro, *et al.*, 2011).

Os animais apresentaram alterações locomotoras, classificadas como estágios convulsivos numerados de 1 a 7. Estágio I: imobilidade e hiperventilação; Estágio II: comportamento de natação semelhante a redemoinhos; Estágio III: movimentos rápidos da direita para a esquerda; Estágio IV: contrações musculares anormais e espasmódicas; Estágio V: convulsões rápidas de tipo clônica; Estágio VI: perda de postura e espasmos por vários minutos; Estágio VII: morte (Alfaro, *et al.*, 2011).

O estudo de Alfaro e colaboradores (2011) introduziu o peixe-zebra como um novo modelo experimental, para o teste de moléculas e fármacos injetáveis, e o ácido caínico como um modelo de indução de crises epilépticas.

Com base, em que o ácido caínico pode ser injetado intraperitonealmente assim tendo a possibilidade de evitar que a droga entre em contato com brânquias, olhos e pele é uma grande vantagem na busca por novos compostos bioativos, evitando variáveis exposições e toxicidade (Mussulini, et al., 2016).

Castell e colaboradores (2014) analisaram a exposição de ovos de *zebrafish* por 72 horas, a um extrato polifenólico na concentração de 100 µM, quanto ao seu efeito neuroprotetor. Embora observada ausência de controles mais adequados, os autores conseguiram verificar importantes alterações neuroquímicas do sistema colinérgico, o que instiga muitos pesquisadores a utilizarem esse modelo para estudar desordens do SNC (Santana, Rico e Burgos, 2012).

Os compostos antioxidantes naturais, como ácido rosmarínico, vem sendo estudados como potentes neuroprotetores, contribuindo para a prevenção de doenças do SNC (Khamse, et al., 2015). Diversos estudos *in vitro*, modelos animais e em seres humanos demonstraram que a suplementação alimentar com essa classe de metabólitos está associada a uma grande melhora na função cognitiva, memória e na prevenção de demências (Santana, Rico e Burgos, 2012).

Inúmeras vias estão relacionadas à capacidade neuroprotetora destes compostos, incluindo ação anti-inflamatória, modulação das vias de sinalização intracelular, modulação da expressão proteica, inibição de caminhos apoptóticos e propriedade antioxidante (Kang, et al., 2013; Geldenhuys e Van Der Schyf, 2013). Os sistemas colinérgico e serotoninérgico apresentam um importante papel nos processos de aprendizagem, percepção da dor e funções de memória, nesse sentido diversos estudos com compostos polifenólicos e doenças neurodegenerativas, bem como epilepsia estão sendo propostos (Falcon, et al. 2016).



**4. PARTE I: VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO DA FRAÇÃO DE**  
***Blechnum brasiliense***

---

---



O texto da parte 1, que no texto integral da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 47 e 55, foi suprimido por tratar-se de informações constantes nos manuscritos em preparação para publicação em periódico científico. Foi realizada a validação de metodologia analítica da fração de *Blechnum brasiliense* para determinar o teor de ácido rosmarínico neste derivado da planta. A planta seca e moída foi extraída por refluxo, utilizando etanol 28% como solvente extrator. Após, o solvente foi evaporado e particionado utilizando solventes de diferentes polaridades, obtendo, assim, a fração acetato de etila, a qual foi utilizada nesta parte do trabalho. O método analítico foi validado utilizando Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência, segundo parâmetros descritos na RDC 899 de 2003 da ANVISA.























**5. PARTE II: MANUSCRITO**

---

---



O texto da parte 2, que no texto integral da dissertação defendida ocupa o intervalo entre as páginas 59 e 84, foi suprimido por tratar-se de informações do manuscrito em preparação para publicação em periódico científico. Foi realizada investigação da atividade anticonvulsivante do extrato bruto e da fração acetato de etila de *Blechnum brasiliense*, bem como do produto isolado ácido rosmanirico, utilizando modelo de indução de convulsão por ácido cainíco em *zebrafish*. Foi avaliada a toxicidade das amostras em modelo utilizando embriões de *zebrafish*, segundo protocolo da OECD e determinadas as doses letais médias.























































## **6. DISCUSSÃO GERAL**

---

---



Muitos são os estudos de compostos bioativos de origem vegetal visando a identificação de substâncias com possíveis atividades biológicas e farmacológicas. O gênero *Blechnum* é um grupo botânico de grande ocorrência no sul do Brasil, porém pouco estudado. Em análise química da espécie *B. brasiliense* foi identificado o ácido rosmarínico como composto majoritário (Cazarolli *et al.*, 2009; Andrade, *et al.*, 2016). Diversas atividades biológicas são atribuídas a esse ácido fenólico (Salin, *et al.*, 2011; Ghaffari, *et al.*, 2014), além de estudos indicando o AR apresenta boa absorção pelo organismo além de baixa toxicidade (Khamse, *et al.*, 2015), esses são alguns dos fatores que o tornam alvo de diferentes estudos biológicos (Cardoso, Jackix e Pietro, 2016).

As amostras testadas neste estudo foram coletadas no mês de setembro de 2016, na cidade de Morro Reuter município do estado do Rio Grande do Sul. Foram secas e trituradas com moinhos de facas, posteriormente realizado a granulometria (1400 um). Foi realizada, previamente a este estudo, a busca por um método de extração com maior rendimento em ácido rosmarínico. Assim, utilizamos a extração por refluxo durante 15 minutos, com solvente extrator etanol 28%, sendo submetido posteriormente ao fracionamento por meio líquido/líquido, com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila. O rendimento do extrato bruto foi de aproximadamente 20% e da fração acetato de etila 1%. O método proposto para quantificação de ácido rosmarínico em frondes de *B. brasiliense* foi desenvolvido e validado de acordo com a legislação vigente e baseando-se na literatura. Para o método em CLUE foi possível comprovar os parâmetros de validação, e o método se mostrou eficaz para o objetivo proposto. Foi possível comprovar a seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez.

O modelo experimental *zebrafish* oferece além de um genoma completamente caracterizado, fisiologia e SNC semelhante aos dos mamíferos, o que o torna um ótimo modelo para estudos de epilepsia (Kundap, *et al.*, 2017). A dualidade larva-adulto, o que permite a investigação mais ampla para doenças neurodegenerativas, como também o desenvolvimento mais rápido do *zebrafish*, o torna um modelo ideal para o estudo de desordens do sistema nervoso central (Kalueff, *et al.*, 2014). O modelo de indução de crises

epilépticas do ácido caínico está relacionado a hiperestimulação do SNC (Mussulini, et al., 2016). Tal modelo também é utilizado para estudar-se dano neuronal e fatores neuropatológicos como hipóxia, isquemia, epilepsia e doença de Alzheimer (Alfaro, et al., 2011). Esse fenômeno de síndrome, já foi descrito em roedores, no qual foram injetados agonistas de glutamato como o ácido caínico, que causa crises epilépticas juntamente com neurodegeneração (Khamse, et al., 2015). Portanto os resultados descritos neste trabalho podem vir a ser fonte de estudo dos efeitos neuprotetores da *B. brasiliense* e seu produto isolado.

Seguindo os objetivos deste trabalho, os ensaios de toxicidade foram realizados afim de se estimar a dose letal média ( $DL_{50}$ ) do extrato bruto, fração de acetato de etila das frondes de *B. brasiliense* e do ácido rosmarínico isolado. Neste contexto, o *zebrafish* tem sido um importante modelo experimental, devido à possibilidade de avaliação de múltiplos parâmetros incluindo: neurotoxicidade, estudos sensoriais, atividade locomotora, cardiotoxicidade, más formações e mortalidade (Rosemberg et al., 2011).

Os ensaios de toxicidade em embriões apresentam um protocolo bem estabelecido pela OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Embora nenhuma toxicidade tenha sido relatada previamente para o AR, frente a culturas celulares (Andrade, et al., 2016), as larvas de *zebrafish* apresentaram alteração nos batimentos cardíacos e na sobrevivência quando expostas ao AR nas maiores concentrações avaliadas. A toxicidade do extrato bruto foi ensaiada em concentrações de 10 a 500 ug/mL, apresentando uma  $DL_{50}$  de 363 ug/mL. Diferença significativa nos batimentos cardíacos foram observadas somente na concentração de 500 ug/mL, indicando baixa toxicidade, podendo estar relacionada à presença de monofluoroacetato (Cook et al., 2014; Carvalho et al., 2016), bem como, potenciais oxalatos de salicilato de metilo (Coelho et al., 2007).

A fração de acetato de etila apresentou uma leve toxicidade nas doses mais altas testadas, apresentando diferença nos batimentos cardíacos a partir de 100 ug/mL e diferença na sobrevivência a partir de 50 ug/mL, em relação ao controle negativo, com  $DL_{50}$  de 196,3 ug/mL. O ácido rosmarínico também

apresentou uma baixa toxicidade nas concentrações testadas, com DL<sub>50</sub> de 250,6 µM. O ácido rosmarínico apresentou diferenças quanto aos batimentos cardíacos na concentração de 100 µM e 500 µM. Quanto à sobrevivência, apresentou diferenças nas concentrações de 100, 250 e 500 µM, em relação ao controle negativo. Em suma, os resultados de toxicidade são satisfatórios, uma vez que foi observada leve toxicidade em concentrações elevadas do extrato, da fração e do ácido rosmarínico.

Resultados semelhantes são descritos para outras plantas, com destaque para a *Carthamus tinctorius* com DL<sub>50</sub> de 345,6 mg/L (Xia, et al., 2017), *Carpesii fructus* com DL<sub>50</sub> de 230,4 mg/L (Xia, et al., 2017) e *Psychotria deflexa* com DL<sub>50</sub> de 72,18 µg/mL (Bertelli, et al., 2017). Assim, a espécie *B. brasiliense* apresenta-se como candidata à investigação de atividades biológicas de seus extratos e produtos isolados, uma vez que sua toxicidade é considerada baixa. Além disso, o AR apresentou um perfil toxicológico similar ao dos fármacos anticonvulsivantes conhecidos como carbamazepina, tiagabina, fenitoína e lamotrigina, com maior tolerabilidade em relação ao diazepam (AFRIKANNOVA et al., 2013).

As doses para varredura anticonvulsivante utilizadas nesse estudo, foram baseadas em pesquisas anteriores sobre bioprospecção e efeito antioxidante (Liu e Jernigan, 2011). Para os ensaios em adultos, as amostras foram diluídas em tampão fosfato, nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 mg/kg. Os animais foram pré-tratados de forma aguda, injetados i.p. com ácido caínico 7,5 mg/kg e observados por 60 minutos. No extrato bruto, observamos aumento significativo no tempo para o primeiro episódio de crise clônica apenas no grupo pré-tratado com 20 mg/kg. Esta dose e a de 10 mg/kg apresentaram diferenças estatísticas na intensidade da crise no intervalo de análise entre 2400-3600 segundos.

Para a fração acetato de etila, as doses de 5 e 10 mg/kg apresentaram diferença significativa no tempo das crises, as doses de 1 e 10 mg/kg apresentaram diferenças significativas na intensidade da crise nos intervalos de 0-1200 segundos. Para a dose de 5 mg/kg, a intensidade da crise foi alterada no intervalo de 2400-3600 segundos. O ácido rosmarínico a 1 mg/kg



apresentou diferença significativa na latência para a primeira crise epilética clônica, também apresentou diferença na intensidade da crise nos intervalos de 0-1200 segundos e 1200-2400 segundos, enquanto a dose de 20 mg/kg apresentou uma diferença na intensidade da crise no tempo de 0-1200 segundos, comparado ao controle.

As diferenças nas doses ativas entre o extrato e a fração podem estar relacionadas à concentração de ácidos fenólicos e do próprio AR (Kyselova 2011). Estudos com o modelo de roedores apontou que o AR aumentou o tempo de latência apenas em dose de 30 mg/kg, quando pré tratado com os modelos de pilocarpina e PTZ (Grigoletto et al., 2016). Em tratamento via oral de AR a 10 mg/kg, o mesmo foi capaz de reduzir a intensidade da crise, quando avaliado em modelo de ácido caínico (Khamse et al., 2015). Porém o AR não conseguiu provocar qualquer efeito em modelo como o engodo provocado pelo PTZ (Coelho et al. 2015), o que nos sugere que o AR tem um potencial efeito sobre os mecanismos de convulsão, mas não na reorganização do SNC.

Os mecanismos descritos para o efeito anticonvulsivo do AR estão relacionados com a ativação do sistema GABAérgico. Estudo *in vitro* do extrato metanólico de *Melissa officinalis* L. demonstrou que o AR inibiu a enzima GABA transaminase (Awad, et al., 2009) o que causa um aumento de GABA no cérebro e diminuição de glutamatergia (Ben-Menachem, 2011). Este resultado é semelhante ao do anticonvulsivante clínico disponível, vigabatrina (VGB), ou ácido 4-amino-5-hexenóico, que foi sintetizada pela primeira vez em 1974 e foi descoberta como droga antiepilética em 2005 por investigadores na França (Brunton, 2012). Assim, a VGB foi o primeiro fármaco antiepilético com seu mecanismo de ação determinado (Yacubian, 2014). Hoje a VGB é eficaz no tratamento da síndrome de West (espasmos infantis) idiopática e criptogênica, também é recomendada em alguns casos em terapia junto a outros antiepiléticos (Henrique-Sousa, et al., 2007).

O efeito anticonvulsivo do AR também pode estar relacionado com a neurotransmissão, estudo de Guginski e colaboradores (2009), mostrou que esse produto natural causou uma inibição em teste de dose-dependente (0,3-3

mg/kg) na resposta nociceptiva após injeção intraplantar de glutamato. A atividade antiepiléptica e anticonvulsivante do gênero *Blechnum* não foi até então relatada. Assim neste trabalho demosntramos que, pelo menos parte dessa atividade, pode ser atribuída ao ácido rosmanírico (Fallarini et al., 2009, Khamse, et al. 2015).



## **7. CONCLUSÃO GERAL**

---

---



Neste trabalho foi validado método analítico por CLUE para a fração acetato de etila, possibilitando a quantificação de ácido rosmarínico na amostra, a qual apresentou teor de, aproximadamente, 0,076 g%. O extrato bruto e a fração acetato de etila de *B. brasiliense*, bem como o ácido rosmarínico isolado da planta apresentaram toxicidade apenas em altas concentrações quando avaliadas em modelo de *zebrafish*. Foram calculadas as DL<sub>50</sub> das amostras, sendo iguais a 363,3 µg/mL para o extrato, 196,3 µg/mL para a fração e 250,3 µM para o ácido rosmarínico.

Este é o primeiro estudo a avaliar o uso da *B. brasiliense* no tratamento de crises epilépticas. Também avaliamos o efeito do ácido rosmarínico, composto majoritário dessa espécie. O modelo em *zebrafish*, utilizando ácido caínico para indução das crises epilépticas, se apresentou como um bom modelo para rastreamento de derivados vegetais e substâncias bioativas. O extrato bruto (20 mg/kg), a fração acetato de etila (5 e 10 mg/kg) e o AR (1 mg/kg) foram capazes de reduzir a crise e aumentar o tempo de latência no modelo de crises epilépticas em *zebrafish*.



## 8. REFERÊNCIAS

---

---





AFRIKANOVA, T.; SERRUYS, A.S.K.; BUENAFE, O.E.M.; CLINCKERS, R.; SMOLDERS, I.; WITTE, P.A.M.; CRAWFORD, A.D.; ESGUERRA, C.V. Validation of the Zebrafish Pentylentetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. **PLoS ONE**. v.8, n.1, e54166. 2013.

ALFARO J.M.; RIPOLL-GÓMEZ J.; BURGOS J.S.; Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. **European Journal of Neuroscience**. v.33, n.7, p.1252-5. 2011.

ANDRADE, J.M.M. **Aplicação de CLAE-DAD-EM e CG-EM na caracterização de *Blechnum* sp. e abordagens *in vitro* e *in silico* para avaliar o perfil multifuncional do ácido rosmarínico em alvos relacionados à neurodegeneração e toxicidade em células-tronco.** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 264 f. 2015.

ANDRADE, J.M.M.; PASSOS, C.S.; RUBIO, M.A.K.; MENDONÇA, J.N.; LOPES, N.P.; HENRIQUES, A.T. Combining *in vitro* and *in silico* approaches to evaluate the multifunctional profile of rosmarinic acid from *Blechnum brasiliense* on targets related to neurodegeneration, **Chemico-Biological Interactions**, v.254, p.135-45. 2016.

AXELORD, H. R.; SCHULTZ, L. P. **A Handbook of Tropical Aquarium Fishes**. New York: McGraw-Hill, 1955.

AWAD, R.; MUHAMMAD, A.; DURST, T.; TRUDEAU, V.L.; ARNASON, J.T. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an *in vitro* measure of GABA transaminase activity. **Phytotherapy Research**. v.23 p.1075–81. 2009.

BAGGIO, S.; MUSSULINI, B.H.; OLIVEIRA, D.L.; GERLAI, R.; RICO, E.P. Embryonic alcohol exposure leading to social avoidance and altered anxiety responses in adult zebrafish. **Behavioural Brain Research**. S0166-4328 v.17 p.30613-7. 2017.

BARABAN, S.C.; TAYLOR, M.R.; CASTRO, P.A.; BAIER, H. Pentylene-tetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience**. v.131, n.3, p.759-68. 2005.

BARROS, I.C.L.; ANDRADE, L.H.C. **Pteridófitas medicinais (samambaias, avencas e plantas afins)**. Editora Universitária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 214 p, 1997.

BEN-MENACHEM, E. Mechanism of action of vigabatrin: correcting misperceptions. **Acta Neurologica Scandinavica Supplementum**. p.5-15. 2011.

BERTELLI, P.R.; BIEGELMEYER, R.; RICO, E.P.; KLEIN-JUNIOR, L.C.; TOSON, N.S.B.; MINETTO, L.; BORDIGNON, S.A.L.; GASPER, A.L.; MOURA, S.; OLIVEIRA, D.L.; HENRIQUES, A.T. Toxicological profile and acetylcholinesterase inhibitory potential of *Palicourea deflexa*, a source of  $\beta$ -carboline alkaloids. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 201, p 44-50, 2017.

BRODIE, M.J.; BESAG, F.; ETTINGER, A.B.; MULA, M.; GOBBI, G.; COMAI, S.; ALDENKAMP, A.P.; STEINHOFF, B.J. Antiepileptic Drugs, and Aggression: An Evidence-Based Reviews. **Pharmacological Reviews**. v.68, n.3, p.563-602. 2016.

BRUNTON, L. L. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**, 12 ed. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2012.

CARDOSO, J.F.; JACKIX, E.A.; PIETRO, L. O papel dos polifenóis na Doença de Alzheimer: revisão sistemática. **Journal of the Health Sciences Institute**. v.34, n. 4, p. 240-5. 2016.

CARVALHO, F.K.L.; COOK, D.; LEE, S.T.; TAYLOR, C.M.; OLIVEIRA, J.B.S.; RIET-CORREA, F. Determination of toxicity in rabbits and corresponding detection of monofluoroacetate in four *Palicourea* (Rubiaceae) species from the Amazonas state, Brazil. **Toxicon**, v.109, p.42–44. 2016.

CASTELL, E.; GALINDO, C.; MONTELL, L.; SEGURA, E.; BAEZA, M.M.; GUILLÉN, V. Effect on zebrafish neurodevelopment and neuro-protection of a

polyphenolic extract olive seeds. **Nutricion Hospitalaria**. v.30, n. 2, p.338-42. 2014.

CAZAROLLI, L. H.; FOLADOR, P.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Signaling pathways of kaempferol-3-neohesperidoside in glycogen synthesis in rat soleus muscle. **Biochimie**, v. 91, n. 7, p. 843-849, 2009.

CHAMBERS, T.C.; FARRANT, P.A. Revision of *Blechnum* (Blechnaceae) in Malesia. **Blumea**. v.46, n.2, p.283-350. 2001.

CHINDO, B.A.; YAU, J.; DANJUMA, N.M.; OKHALE, S.E.; GAMANIEL, K.S.; BECKER, A. Behavioral and anticonvulsant effects of the standardized extract of *Ficus platyphylla* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 351-360, 2014.

CLEMENTE, D.; PORTEROS, A.; WERUAGA, E.; ALONSO, J.R.; ARENZANA, F.J.; AIJON, J.; AREVALO, R. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: Histochemical and immunohistochemical analysis. **The Journal of Comparative Neurology**. v.474, p.75-107. 2004.

COELHO, E.G.; AMARAL, A.C.; FERREIRA, J.L.; DOS SANTOS, A.G.; PINHEIRO, M.L.; SILVA, J.R. Calcium oxalate crystals and methyl salicylate as toxic principles of the fresh leaves from *Palicourea longiflora*, an endemic species in the Amazonas state. **Toxicon**, v.49 n.3, p.407–409. 2007.

COOK, D.; LEE, S.T.; TAYLOR, C.M.; BASSÜNER, B.; RIET-CORREA, F.; PFISTER, J.A.; GARDNER, D.R. Detection of toxic monofluoroacetate in *Palicourea* species. **Toxicon**. v.80, p.9–16. 2014.

COSTA, R. S. et al. Ocimum gratissimum Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. **International Immunopharmacology**. v. 13, p. 126-134, 2012.

CRAWFORD, A. D.; ESGUERRA, C. V.; DE WITTE, P. M. Fishing for drugs from nature: Zebrafish as a technology platform for natural product discovery. **Planta Medica**. v. 74, p. 624–632, 2008.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DITTRICH, VINÍCIUS ANTONIO DE OLIVEIRA. **Estudos taxonômicos no gênero Blechnum L. (Pterophyta : blechnaceae) para as regiões sudeste e sul do Brasil**. 209 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2005.

DITTRICH, V.A.O.; HERINGER, G.; SALINO, A. Blechnaceae. In: Cavalcanti, T.B.; Ramos, A.E. (org.). **Flora do Distrito Federal, Brasil**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília. vol. 6. p. 91-108. 2007.

DUBOIS, M. et al. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: Discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 51, n. 8, p. 2575-2579, 2008.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J.B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, Accepted Manuscript, 2016.

ELICEIRI, B. P.; GONZALEZ, A. M.; BAIRD, A. Zebrafish model of the blood-brain barrier: morphological and permeability studies. **Methods on Molecular Biology**, v. 686, p. 371-8, 2011.

ESCH, C.; SLIEKER, R.; WOLTERBEEK, A.; WOUTERSEN, R.; GROOT, D. Zebrafish as potential model for developmental neurotoxicity testing: A mini review. **Neurotoxicology Teratology**, v. 34, p. 545-553, 2012.

EYO, U.B.; MURUGAN, M.; WU, L.J. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. **Glia**. 2016.

FALCO, A.; SCHNEIDER, C.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A. Alzheimer's disease: etiological hypotheses and treatment perspectives. **Química Nova**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 63-80, 2016.

FALLARINI, S.; MIGLIO, G.; PAOLETTI, T.; *et al.* Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.157, p.1072–84. 2009.

FLORA DO BRASIL. 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 18 fev. de 2018.

FRANZ, I.; SCHMITT, E.J.L. *Blechnum brasiliense* Desv. (pteridophyta, blechnaceae): estrutura populacional e desenvolvimento da fase esporofítica. **Pesquisas em Botânica**, v. 56, p. 173-184, 2005.

GHAFFARI, H.; VENKATARAMANA, M.; GHASSAM, B. J.; NAYAKA, C. S.; NATARAJUC, A.; GEETHA, N. P.; PRAKASHA, H. S. Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced neuronal cell damage in N2A cells. **Life Sciences**, v. 113, p. 7-13, 2014.

GELDENHUYS, W. J.; VAN DER SCHY, C. J. Designing drugs with multi-target activity: the next step in the treatment of neurodegenerative disorders. **Expert Opinion in Drug Discovery**, v. 8, n. 2, p. 115-129, 2013.

GERLAI, R. Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). **Methods on Cellular Biology**. v.101, p.249-270. 2011.

GHENO, E.M.; ROSEMBERG, D.B.; SOUZA, D.O. **Produção e impacto científico da utilização do Zebrafish como um modelo alternativo de pesquisa no Brasil**. Anais X Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências – X ENPEC Águas de Lindóia, SP ,2015.

GILL, R.S.; MIRSATTARI, S.M.; LEUNG, L. S. Resting state functional network disruptions in a kainic acid model of temporal lobe epilepsy. **NeuroImage: Clinical**. v.13, p. 70-81. 2017.

GOETZ, M.N.B.; FRAGA, L.L.; SCHMITT, J.L. Florística e aspectos ecológicos de samambaias e licófitas em um parque urbano do Rio Grande do Sul, brasil. **Pesquisas em Botânica**, v.63, p.165-176. 2012.

GRANATO, M. et al. Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. **Development**, v.123, p.399–413. 1996.

GRIGOLETTO, J.; OLIVEIRA, C.V.; GRAUNCKE, A.C.; SOUZA, T.L.; SOUTO, N.S.; FREITAS, M.L.; FURIAN, A.F.; SANTOS, A.R.; OLIVEIRA, M.S. Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice. **Epilepsy & Behavior**. v.62, p. 27-34. 2016.

GUGINSKI, G.; LUIZ, A. P.; SILVA, M. D.; MASSARO, M.; MARTINS, D. F.; CHAVES, J.; MATTOS, R.W.; SILVEIRA, D.; FERREIRA, V.M.M.; CALIXTO, J.B.; SANTOS, A. R. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.93, n.1, p.10-16. 2009.

HENRIQUES-SOUZA, A.M.M.; LAURENTINO, L.A.J.S.G.; Vigabatrina no Tratamento da Síndrome de West. **Arquivos on Neuropsiquiatry**; v. 65, p. 144-149, 2007.

HOOKER, C.W.; LOTT, W.B.; HARRICH, D. Inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase target distinct phases of early reverse transcription. **Journal of Virology**, v. 75, p. 3095–3104, 2001.

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, London, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013.

HUANG, S.; ZHENG, R. Rosmarinic acid inhibits angiogenesis and its mechanism of action in vitro. **Cancer letters**, v. 239, p. 271-80, 2006.

HUNT, R.F.; HORTOPAN, G.A.; GILLESPIE, A.; BARABAN, S.C. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. **Experimental Neurology**, v.237, n.1, p.199-206. 2012.

JONES, L.J.; NORTON, W.H. Using zebrafish to uncover the genetic and neural basis of aggression, a frequent comorbid symptom of psychiatric disorders. **Behaviour Brain Research**, v.276, p.171-80. 2015.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; GERLAI, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. **Trends on Pharmacological Sciences**, v. 35, n. 2, p. 63-75, 2014.

KANADA, A.; NISHIMURA, Y.; YAMAGUCHI, J.Y.; *et al.* Extract of *Ginkgo biloba* leaves attenuates kainate-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration of rat cerebellar granule neurons. **Biol Pharm Bull.** v.28 p.934–6. 2005.

KANG, H. J.; KIM, H. S.; JEON, I. H.; MOK, J. Y.; HAN, K. S.; JANG, S. Effects of antioxidant and blood flow improvement of grape leaf extract and resveratrol from *Vitis rotundifolia*. **Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 11, p.1736-1743, 2013.

KHAMSE, S.; SADR, S.S.; ROGHANI, M.; HASANZADEH, G.; MOHAMMADIAN, M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms, **Pharmaceutical Biology**, v.53, n.12, p.1818-1825, 2015.

KIASALARI, Z.; MOHSEN, K.; MEHRDAD, R.; HAMID, H.; YASER, A. Antiepileptic and antioxidant effect of hydroalcoholic extract of *Ferula assafoetida* gum on pentylentetrazole-induced kindling in male mice. **Basic and Clinical Neuroscience**, v.4 p.299–306. 2013.

KOSAR, M.; GÖGER, F.; BASER, K.H.C. *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.7, p.2369-74, 2008.

KUMAR, V. Potential medicinal plants for CNS disorders: an overview. **Phytotherapy Research**, v.20 p.1023–35. 2006.

KUNDAP, U.P.; KUMARI, Y.; OTHMAN, I.; SHAIKH, F.M. Zebrafish as a Model for Epilepsy-Induced Cognitive Dysfunction: A Pharmacological, Biochemical and Behavioral Approach. **Frontiers in Pharmacology**, v.8, p.515. 2017.



KYSELOVA, Z. Toxicological aspects of the use of phenolic compounds in disease prevention. **Interdisciplinary Toxicology**. v. 4, n. 4 , p. 173–183. 2011.

LAI, H.Y.; LIM, Y.Y.; KIM, K.H. Blechnum orientale Linn - a fern with potential as antioxidant, anticancer and antibacterial agent. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 30, p. 10-15, 2010.

LAWRENCE, C. The husbandry of zebrafish (Danio rerio): a review. **Aquaculture**, New York, v. 269, n. 1-4, p. 1-20, 2007.

LBE - **Liga Brasileira de Epilepsia** 2016. Disponível em: <http://epilepsia.org.br/>  
Acessado em: 18-09-2017.

LEE, J.; JUNG, E.; LEE, J.; HUH, S.; BOO, Y. C.; HYUN, C. G.; KIM, Y. S.; PARK, D. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. **Brazilian Journal of Dermatology**, v.157, n.2, p.242-248. 2007.

LI, J.; CHEN, Z.; GAO, L-Y.; et al. A transgenic zebrafish model for monitoring xbp1 splicing and endoplasmic reticulum stress in vivo. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 137, p. 33-44, 2015.

LIAO, Y. F.; CHIOU, M. C.; TSAI, J. N.; WEN, C. C.; WANG, Y. H.; CHENG, C. C.; CHEN, Y. H. Resveratrol treatment attenuates the wound-induced inflammation in zebrafish larvae through the suppression of myeloperoxidase expression. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 19, p. 167-173, 2011.

LIU, X.; JERNIGAN, C. Activation of the opioid  $\mu$ 1, but not  $\delta$  or  $\kappa$ , receptors is required for nicotine reinforcement in a rat model of drug self-administration. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 35, p. 146–153. 2011.

LÖSCHER, W.; BRANDT, C. Prevention or Modification of Epileptogenesis after Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. **Pharmacological Reviews**, v.62, n.4, p.668–700. 2010.

MAKINO, T.; et al. Effect of oral treatment of *Perilla frutescens* and its constituents on type-I allergy in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, p. 1206–1209, 2001.

MAŠKOVIĆ, P.; et al. Phenolic compounds and biological activity of *Kitaibelia vitifolia*. **Journal of Medical Food**, v. 14, n. 12, p. 1617-23, 2011.

MATHUR, P.; GUO, S. Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. **Neurobiology of Disease**, Oxford, v. 40, p. 66-72, 2010.

MAZUMBER, A.; et al. Curcumin analogs with altered potencies against HIV-1 integrase as probes for biochemical mechanisms of drug action. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 3057–3063, 1997.

MOTTA, E. V. S.; PINTO, N. C. C.; DUQUE, A. P. N.; MENDES, R. F.; BELLOZI, P. M. Q.; SCIO, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MUSSULINI, B.H.; LEITE, C.E.; ZENKI, K.C.; MORO, L.; BAGGIO, S.; RICO, E.P.; ROSEMBERG, D.B.; DIAS, R.D.; SOUZA, T.M.; CALCAGNOTTO, M.E.; CAMPOS, M.M.; BATTASTINI, A.M.; OLIVEIRA, D.L. Seizures induced by pentylentetrazole in the adult zebrafish: a detailed behavioral characterization. **PLoS One**, v.8, n.1, e54515. 2013.

MUSSULINI, BEM HUR MARINS. **MODULAÇÕES ENERGÉTICAS CEREBRAIS PERMITEM A MANUTENÇÃO DE CRISES EPILÉPTICAS PROLONGADAS**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 117 f. 2017.

MUSSULINI, B.M.; BAGGIO, S.; MORO, L.; DIAS, R.D.; CALCAGNOTTO, M.E.; RICO, E.P.; OLIVEIRA, D.L. Zebrafish as an animal model to study epileptic seizures and epileptic syndromes. **Current Psychopharmacology**, v. 5, n. 1. 2016.

MUTO, A.; et al. Forward genetic analysis of visual behavior in zebrafish. **PLoS Genetics**, v.1, n.66, 2005.

NEWMAN, M.; EBRAHIMIE, E.; LARDELLI, M. Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. **Frontiers in Genetics**, v. 5; p. 189. 2014.

NONATO, F.R.; BARROS, T.A.A.; LUCHESE, A.M.; OLIVEIRA, C.E.C.; SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P.; VILLARREAL, C.F. Antiinflammatory and antinociceptive activities of *Blechnum occidentale* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 102-107, 2009.

OKSMAN-CALDENTEY, K.; INZÉ, D. Trends in Plant. **Science**, v. 9, n. 9, p. 433. 2004.

OMS - **World Health Organization** 2016. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>. Acessado em: 18-09-2017.

OSAKABE, N.; et al. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: Anti-carcinogenic effects of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin mode. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 549–557, 2004.

PETERSON, M.; SIMMONDS, M.S.J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, p. 121–125, 2003.

PRADO, J.; et al. Diversity of ferns and lycophytes in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, n. 4, 2015.

PRADO, J.; SYLVESTRE, L. Pteridófitas. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2013.

PRADO, J.; SYLVESTRE, L. **Samambaias e Licófitas in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro 2016.

PROCTOR, G.R. Ferns of Puerto Rico and the Virgin Islands. **Memoirs of the New York Botanical Garden**. v.53 p.1-389. 1989.

PUTY, B.; MAXIMINO, C.; BRASIL, A.; DA SILVA, W.L.; GOUVEIA, A.J.R.; OLIVEIRA, K.R.; et al. Ascorbic acid protects against angiogenic-like effect induced by methylmercury in zebrafish: action on the serotonergic system. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 365-70. 2014.

QIAO, S.; et al. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. **Free Radicals Research**. v. 39, p. 995-1003, 2005.

QUINTANS JÚNIOR, L.J.; LIMA, J.T.; ALMEIDA, J.R.G.S.; BERDOR, C.N.G.; JUNIOR, R.G.S. Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 88, n. 4, p. 163-166, 2007.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. v. 7ª ed. p. 768, 2012.

REDDY, D.S.; KURUBA, R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. **International Journal of Molecular Science**, v. 5, n. 14, p. 9, 2013.

REN, P.; et al. Rosmarinic acid inhibits 6-OHDA-induced neurotoxicity by anti-oxidation in MES23.5 cells. **Journal of Molecular Neuroscience**.v. 39, p. 220–225, 2009.

ROSEMBERG, D.B.; et al. Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. **Plos One**, v. 6, n. 5, 2011.

ROTHFELS, C.J.; SUNDUE, M.A.; KUO, LI-Y.; LARSSON, A.; KATO, M.; SCHUETTPELZ, E.; PRYER, K.M. A revised family-level classification for eupolypod II ferns (Polypodiidae: Polypodiales). **Taxonomy**, v. 61, n. 3, p. 515–533. 2012.

SALIN, O. P.; et al. Effects of coadministration of natural polyphenols with doxycycline or calcium modulators on acute *Chlamydia pneumoniae* infection in vitro. **Journal of Antibiotics**, v.64, n. 11, p. 747-52, 2011.

SANBONGI, C.; et al. Rosmarinic acid in *perilla* extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 34, p. 971–977, 2004.

SANTANA, S.; RICO, E.P.; BURGOS, J.S. Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer's disease? **American Journal of Neurodegenerative Diseases**, v. 1, n. 1, p. 32-48. 2012.

SANTIAGO, A.C.P.; BARROS I.C.L.; DITTRICH, V.A.O. Samambaias e licófitas do estado de Pernambuco, Brasil: Blechnaceae. **Rodriguésia**, v. 65, n. 4, p. 861-869. 2014

SANTOS, R.L.; GUIMARÃES, G.P.; NOBRE, M.S.C.; PORTELA, A.S. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.13, n.4, p. 486-491,2011.

SCHOUSBOE, A.; MADSEN, K.K.; BARKER-HALISKI, M.L.; WHITE, H.S. The GABA synapse as a target for antiepileptic drugs: an historical overview focused on GABA transporters. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 10, p. 1980-7, 2014.

SHIH, Y.H.; CHEIN, Y.C.; WANG, J.Y.; FU, Y.S. Ursolic acid protects hippocampal neurons against kainate-induced excitotoxicity in rats. **Neuroscience Letters**, v. 362 p.136–40. 2004.

SHIHA, A.A.; CRISTÓBALA, J.; DELGADOA, M.; DE LA ROSA, R.F.; BASCUÑANA, P.; POZOA, M.A.; GARCÍA-GARCÍA, L. Subacute administration of fluoxetine prevents short-term brain hypometabolism and reduces brain damage markers induced by the lithium-pilocarpine model of epilepsy in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 111, p. 36–47. 2014.

SHORVON, S. D. The etiologic classification of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1052-7, 2011.

SMITH, A.R.; PRYER, K.M.; SCHUETTPELZ, E.; KORALL, P.; SCHNEIDER, H.; WOLF, P.G. A classification for extant ferns. **Taxonomy**, v. 55, p. 705–731, 2006.

SUCHER, N.J.; CARLES, M.C.; A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. **Epilepsy Behaviour**, v. 52, p. 308-318. 2015.

SWARUP, V.; GHOSH, J.; GHOSH, S.; SAXENA, A.; BASU, A. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3367–3370, 2007.

SWIADER, M.J.; ŁUSZCZKI, J.J.; PARUSZEWSKI, R.; S`WIADER, K.; TURSKI, W.A. Protective action of nicotinic acid benzylamide in a variety of chemically-induced seizures in mice. **Pharmacological Reports**, v. 68, p. 297–300. 2016.

SZLISZKA, E.; KROL, W. Polyphenols isolated from propolis augment TRAIL-induced apoptosis in cancer cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, ID 731940, 2013.

TASLIMI, P.; CAGLAYAN, C.; GULCIN, I. The impact of some natural phenolic compounds on carbonic anhydrase, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and  $\alpha$ -glycosidase enzymes: An antidiabetic, anticholinergic, and antiepileptic study. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, e21995. p.1-7. 2017.

TCHEKALAROVA, J.; PETKOVA, Z.; PECHLIVANOVA, D.; MOYANOVA, S.; KORTENSKA, L.; MITREVA, R.; et al. Prophylactic treatment with melatonin after status epilepticus: effects on epileptogenesis, neuronal damage and behavioral changes in a kainate model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behaviour**, v.27, p.174–187. 2013.

TIEDEKEN, J.A.; RAMSDELL, J.S. Embryonic exposure to domoic Acid increases the susceptibility of zebrafish larvae to the chemical convulsant pentylenetetrazole. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 11, p. 1547-52. 2007.

TOBIA, C.; et al. Zebrafish embryo as a tool to study tumor/endothelial cell cross-talk. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular Basis of Disease**, v. 1832, n.9, p. 1371-1377, 2013.

TRAN, S.; GERLAI, R. Recent advances with a novel model organism: Alcohol tolerance and sensitization in zebrafish (*Danio rerio*). **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 55, p. 87-93, 2014.

TRYON, R.M.; TRYON, A.F. Ferns and allied plants, with special reference to tropical America. **New York: Springer-Verlag**. 1982.

VERMOESEN, K.; SERRUYS, A.S.; LOYENS, E.; et al. Assessment of the convulsant liability of antidepressants using zebrafish and mouse seizure models. **Epilepsy Behaviour**, v. 22, n. 3, p. 450-60. 2011.

VRIES, E.E.; MUNCKHOFA, B.V.D.; BRAUNA, K.P.J.; ROYEN-KERKHOF, A.V.; JAGERB, W.; JANSENA, F.E. Inflammatory mediators in human epilepsy: A systematic review and meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, n. 63, p. 177–190, 2016.

XIA, Q.; LUO, J.; MEI, X.; WANG, Y.; HUANG, W.; WANG, J.; YANG, R.; LIN, Z.M.R. A developmental toxicity assay of *Carpesii Fructus* on zebrafish embryos/larvae. **Toxicology Research**, v. 00, p. 1-7. 2017.

XIA, Q.; MA, Z.; MEI, X.; LUO, J.; WANG, Y.; LI, T.; FENG, Y.; NI, Y.; ZOU, Q.; LIN, R. Assay for the developmental toxicity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) to zebrafish embryos/larvae, **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, 13p. 2017.

XIAO, F.; et al. Clinical and Electroencephalographic (EEG) Features Associated With Refractoriness in Benign Childhood Epilepsy With Centrotemporal Spikes. **Journal of Child Neurology**, v. 30, n. 12, p. 1591-7, 2015.

WANG, J.; et al. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **Journal of Molecular Neuroscience**. v. 47, n. 1, p.113-9, 2012.

YACUBIAN, E.M.T.; CAICEDO, G.C.; POHL, L.R. (Ed.) **Tratamiento farmacológico de las epilepsias**. São Paulo: Leitura Médica, 2014.

YOW, H.Y.; AHMAD, N.; MAKMOR BAKRY M. Pathogenesis of Epilepsy: Challenges in Animal Models. **Iran Journal of Basic and Medicinal Sciences**, v. 16, p. 1119-1132. 2013.

WANG, N.; MI, X.; GAO, B.; GU, J.; WANG, W.; ZHANG, Y.; WANG, X. Minocycline inhibits brain inflammation and attenuates spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience**, v. 287, p. 144–156. 2015.

ZHANG, J.J.; et al. Rosmarinic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatic stellate cells. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 34, n. 3, p. 343-8, 2011.

ZHOU, Y.; DANBOLT, N.C. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 121, n. 8, p. 799-81. 2014.

ZHU, H.L.; WANG, Y.T.; LI, B.C.; XIANG, C.; HE, J.; LI, P. Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities. **Epilepsia**, v. 55, n. 1, p. 3–16, 2014.









Os anexos, que no texto integral da dissertação defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 117 e 135, foi suprimido por tratar-se de informações constantes no manuscrito em preparação para publicação em periódico científico.









































