

**Triagem farmacológica da ayahuasca em cultura
de células tumorais e em modelos de nocicepção e
de ansiedade**

(Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis)

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

MARIANA CECCHETTO FIGUEIREDO

Triagem farmacológica da ayahuasca em cultura de células tumorais e em
modelos de nocicepção e de ansiedade

(Banisteriopsis caapi e Psychotria viridis)

ORIENTAÇÃO: PROF. DR. JOAO ERNESTO DE CARVALHO

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em
Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título
de Mestra em Clínica Médica na área de concentração Ciências Básicas.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
MARIANA CECCHETTO FIGUEIREDO, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOAO ERNESTO DE CARVALHO.

Assinatura do Orientador

Campinas
2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F469a Figueiredo, Mariana Cecchetto, 1980-
Triagem farmacológica em cultura de células tumorais, em modelos de
nociceção e de ansiedade (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) / Mariana
Cecchetto Figueiredo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: João Ernesto de Carvalho.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de
Ciências Médicas.

1. Banisteriopsis. 2. Ansiolíticos. 3. Atividade antinociceptiva. 4.
Nociceptividade. 5. Atividade antiproliferativa. I. Carvalho, João Ernesto de. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Pharmacological screening of ayahuasca in tumor cells culture,
nociception and anxiety (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*)

Palavras-chave em inglês:

Banisteriopsis

Anti-anxiety agents

Antinociceptive activity

Nociception

Antiproliferative assay

Área de concentração: Ensino em Saúde

Titulação: Mestra em Clínica Médica

Banca examinadora:

João Ernesto de Carvalho [Orientador]

Rodney Alexandre Ferreira Rodrigues

Debora Barbosa Vendramini Costa

Data de defesa: 22-11-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

MARIANA CECCHETTO FIGUEIREDO

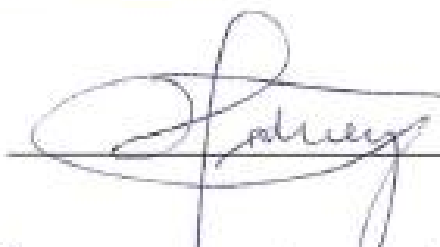
ORIENTADOR: PROF. DR. JOAO ERNESTO DE CARVALHO

MEMBROS:

1. PROF. DR. JOAO ERNESTO DE CARVALHO



2. PROF. DR. RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES



3. PROF. DR. DÉBORA BARBOSA VENDRAMINI COSTA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 22 de novembro de 2013

Agradecimentos

A Deus, pela dádiva da vida...

A meus pais Darcy e Maria Helena, pela educação e ensinamentos de caráter e perseverança...

Ao meu irmão Eduardo, pela confiança em mim depositada...

Ao meu namorado Humberto, que sempre me apoiou a continuar nesta caminhada, sempre ao meu lado nos momentos de angustias e alegrias...

Ao meu orientador João Ernesto, pelos conhecimentos prestados...

Às grandes amigas Mary Ann e a Liana, pela amizade, ajuda e compreensão...

A todos os técnicos e estagiários que colaboraram de forma singular com a realização deste trabalho...

Ao CPQBA, pela oportunidade ímpar e facilidades oferecidas...

À Universidade São Francisco na pessoa da professora Liana Melo-Thomas uso de equipamentos, instalações e orientação...

Ao Centro Espírita Beneficente União do Vegetal pelo fornecimento da ayahuasca.

A grande família DFT, uma família muito unida!!! Por sempre estarem nos momentos bons e ruins... Ana P, Sica, Aninha, Karin, Rafa, Fabi, Gabi, Adriana, Giovanninhasss, Paulass, Débora e Ana Paula.

As minhas queridas amigas, irmãs: Michelle e Vanessa, pelo apoio e carinho.

A todos meus amigos e amigas, de longe ou de perto, que torcem e vibram pelo meu sucesso...

Ao CNPq, Fapesp, Capes e CPQBA pelo apoio financeiro...

...meu mais sincero, **OBRIGADA!**

**“Por mais longa que seja a caminhada, o mais importante
é dar o primeiro passo.” (Vinícius de Moraes)**

Lista de Figuras

Figura 1	Caule de <i>Banisteriopsis caapi</i> .	19
Figura 2	Folhas de <i>Psicotria viridis</i> .	20
Figura 3	Estruturas químicas dos principais alcaloides presentes na ayahuasca: dimetiltripamina, tetrahidroharmina, harmina, harmalina, serotonina.	21
Figura 4	Preparo das duas espécies.	29
Figura 5	Preparo na comunidade.	30
Figura 6	Preparo do Mariri e chacrona	30
Figura 7	Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de atividade antiproliferativa.	47
Figura 8	Atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> da Ayahuasca em painel de linhagens tumorais após 48 horas de tratamento.	56
Figura 9	Gráfico de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos previamente tratados com ayahuasca.	61
Figura 10	Gráfico de reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados com ayahuasca.	62

Figura 11	Gráfico relacionando o número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz (NEBF) de ratos que receberam ayahuasca em dose única ou em doses repetidas (15 dias intercalados) de 1000 mg/Kg (vo) e veículo 20 min antes da sessão experimental.	65
Figura 12	Gráfico relacionando o número de entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz (NEBA) de ratos que receberam ayahuasca em dose única ou em doses repetidas (15 dias intercalados) de 1000 mg/Kg (vo) e veículo 20 min antes da sessão experimental.	65
Figura 13	Gráfico relacionando o tempo de permanência no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado de ratos que receberam ayahuasca em dose única ou em doses repetidas (15 dias intercalados) de 1000 mg/Kg (vo) e veículo, 20 min antes da sessão experimental.	66
Figura 14	Efeito da Ayahuasca sobre número de cruzamentos em ratos com deambulação livre em campo aberto tratados com dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas.	68
Figura 15	Efeito da Ayahuasca no número de levantamentos em ratos com deambulação livre em campo aberto após administração de dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas	68
Figura 16	Efeito da Ayahuasca no número de autolimpeza, em ratos com deambulação livre em campo aberto, após administração de dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas.	69
Figura 17	Efeito da Ayahuasca no número de bolos fecais em ratos com deambulação livre em campo aberto, após administração de dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas.	69

Lista de Tabelas

Tabela 1	Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.	45
Tabela 2	Avaliação toxicidade aguda do EB ayahuasca pelas vias intraperitoneal e oral.	54
Tabela 3	Evolução dos parâmetros na dose de 2000mg/kg do EB da ayahuasca.	54
Tabela 4	Valores de GI50 (em µg/mL) após o tratamento com ayahuasca frente às linhagens tumorais e não-tumorais.	57
Tabela 5	Hemograma avaliado após os tratamentos agudo e crônico em ratos adultos com ayahuasca 1,000 mg/kg, em dias alternados por 15 dias.	70

Lista de Abreviaturas

AIA – Ácido – 3 - indolacético

DL50 – Dose letal 50

DMT – N, N-dimetiltriptamina

DMSO – Dimetilsufoxido

GABA – Ácido gama- aminobutírico

GI50 – Growth inhibition 50%

HBG – concentração de hemoglobina

HCT – Hematócrito

HRL - Harmalina

HRM - Harmina

IP3 – Trifosfato de inositol

LCE – Labirinto em cruz elevado

MAO-A – Monoaminoxidase A

MCH – hemoglobina celular média

MCHC – concentração de hemoglobina celular média

MCV – volume corpuscular médio

NEBF – Número de entradas no braço fechado

NEBA – Número de entradas no braço aberto

PLT – contagem total de plaquetas

RBC – contagem total de eritrócitos

5HT – Serotonina

SNC – Sistema nervosa central

SRB – Sulforrodamina B

TBA – Tempo braço aberto

TCA – Ácido tricloroacético

THH - Tetrahydroharmina

UDV – União do vegetal

WBC - contagem total de leucócitos

Sumário

Resumo	xvi
Abstract	xvii
1.Introdução	18
2.Revisão Bibliográfica	24
2.1.Histórico Ayahuasca X CPQBA	24
2.2.Plantas medicinais e Ayahuasca	26
2.3.As Religiões	27
2.4.Aspectos Farmacológicos da Ayahuasca	33
2.4.1.Principais efeitos da Ayahuasca	33
2.4.2.Farmacocinética da Ayahuasca	35
2.4.3.Serotonina e a ansiedade	37
2.4.4.Aspectos Toxicológicos	39
3. Objetivos	42
3.1. Geral	42
3.2. Específico	42

4. Material e Métodos	43
4.1.Processamento Fitoquímico	43
4.2. Farmacologia e Toxicologia	43
4.2.1.Animais	43
4.2.2.Drogas e Reagentes	44
4.2.3.Avaliação Toxicidade Aguda – vias intraperitoneal e oral	44
4.2.4. Atividade Antiproliferativa em linhagens tumorais	44
4.2.4. Análise da atividade em cultura de células tumorais humanas	44
4.2.4.1. Cultivo Celular	44
4.2.4.2. Preparo das suspensões celulares	45
4.2.4.3.Preparo e aplicação das amostras	46
4.2.4.4. Análise dos Resultados	46
4.2.5.Teste de Contorções abdominais induzidas por ácido acético	49
4.2.6.Teste de Algesia induzida por calor (Placa quente)	49

4.2.7.Labirinto em cruz elevado	49
4.2.8.Testes do Campo aberto	50
4.3.Análise estatística	51
5.Resultado e Discussão	52
6.Conclusão	72
7.Referências Bibliográficas	73
8.Anexos	83

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo realizar uma triagem inicial da ayahuasca em cultura de células e em modelos de nocicepção e ansiedade. A ayahuasca é uma decocção de duas plantas (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) com ação alucinógena, utilizada por diversas religiões no Brasil. As principais substâncias relacionadas com as atividades no sistema nervoso central são a DMT(dimetiltriptamina), agonista serotoninérgico dos receptores 5HT_{1A}, 2A/2C e as β -carbolinas, inibidoras da monoaminoxidase-A (MAO), encontradas na *P. viridis* e *B. caapi*, respectivamente. Nos últimos anos, a ayahuasca se espalhou pela Europa e Estados Unidos, chamando a atenção dos pesquisadores quanto aos seus efeitos. Desta forma, o presente trabalho revelou que a ayahuasca possui atividade sobre a nocicepção em modelos de contorção abdominal e placa quente, atividade ansiolítica em ratos submetidos aos testes de labirinto em cruz elevado (LCE) e efeito citostático leve em cultura de células tumorais humanas de mama (MCF-7), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT-29), mama resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR).

Palavras-chave: Ayahuasca, ansiolítico, nocicepção, antiproliferativa.

Abstract

This study aimed to perform an initial screening of ayahuasca in cultured cells and in models of nociception and anxiety. Ayahuasca is a decoction of two plants (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) with hallucinogenic action, used by various religions in Brazil. The main activities related substances in the central nervous system are DMT (dimethyltryptamine) , serotonin 5HT1A receptor agonist, 2A/2C and β - carbolines , inhibiting monoamine oxidase -A (MAO) , found in *P. viridis* and *B. caapi* , respectively. In recent years, ayahuasca has spread to Europe and the United States, calling the attention of researchers for their effects. Thus , the present study showed that ayahuasca has activity on nociception in models writhing and hot plate , anxiolytic activity in rats submitted to the elevated maze tests (EPM) and light cytostatic effect on cultured human tumor cells breast (MCF -7) , kidney (786-0) , lung (NCI- H460) , prostate (PC -3), ovarian (OVCAR -3) , colon (HT -29) , breast , multidrug resistente (NCI- ADR).

Keywords: Ayahuasca, anxiolytic, nociception, antiproliferative

1. INTRODUÇÃO

A ayahuasca é conhecida em diferentes culturas pelos seguintes nomes: yajé, caapi, natema, pindé, kahi, mihi, dápa, bejuco de oro, vine of gold, vine of the spirits, vine of the soul e a transliteração para a língua portuguesa resultou em hoasca. Também é conhecida amplamente no Brasil como “chá do Santo Daime” ou “vegetal”. Este nome, tanto se aplica à bebida preparada por meio da mistura da *Banisteriopsis caapi* e da *Psychotria viridis*, quanto à primeira das plantas. As diversas preparações/decoções geralmente contêm os talos desfiados da *Banisteriopsis caapi* ou espécies correlatas mais as folhas da *Psychotria viridis*. Os métodos de preparo variam conforme o grupo, geralmente na forma de decocto ou por extração aquosa a frio deixando-se em descanso por aproximadamente 24 horas (Goulart, 2004).

Além do cipó *Banisteriopsis caapi*, conhecido popularmente como mariri e do arbusto *Psychotria viridis*, conhecida como chacrona, (Figuras 1 e 2), essa bebida pode ser preparada com a *Banisteriopsis muricata*, com a *Diplopterys cabrerana* ou com a *Psychotria cartagenensis*. (Ott, 1999; Mckenna, 2004).

A *B. caapi*, é um cipó ou parreira gigante pertencente à família *Malpighiaceae* e identificada por Spruce, é nativa das zonas tropicais da América do Sul e Antilhas, (Grob, 2006). Esse cipó produz alcaloides pertencentes ao grupo das β -carbolinas potentes inibidores reversíveis da MAO-A, sendo a harmina (HRM), a harmalina (HRL) e a tetraidro-harmina THH) os mais abundantes (Callaway, 1999).

Figura 1: Caule de *Banisteriopsis caapi* (Fotografia obtida pelo Dr. João Ernesto de Carvalho, durante coleta realizada pela União do Vegetal na região de Manaus).

Banisteriopsis caapi



Figura 2: *Psychotria viridis* (Fotografia obtida pelo Dr. João Ernesto de Carvalho, durante coleta realizada pela União do Vegetal na região de Manaus).

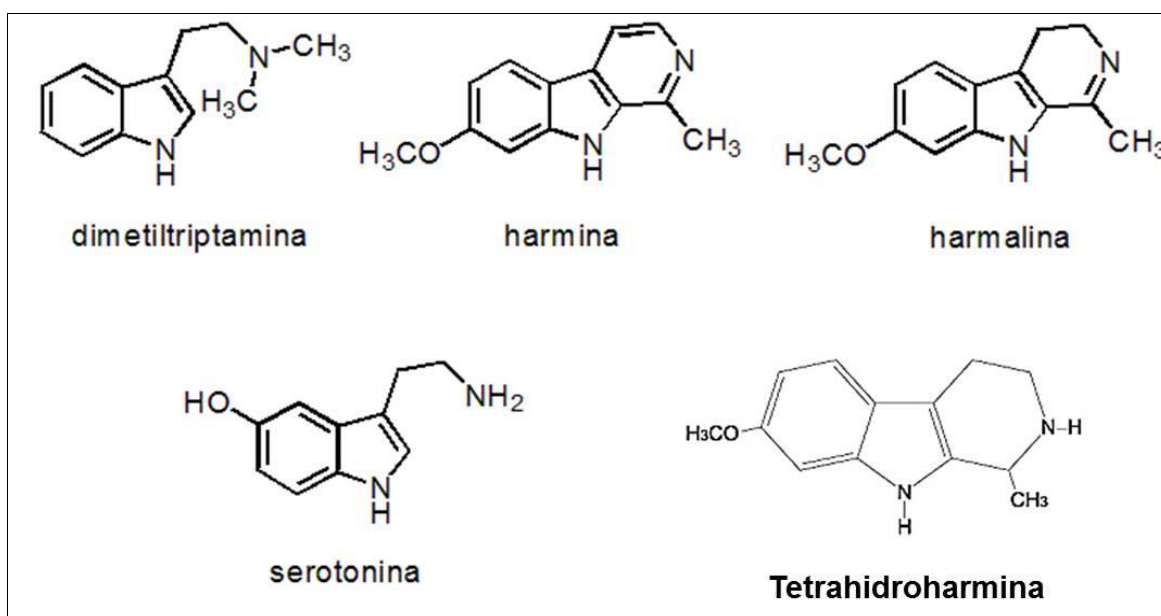
Psychotria viridis



Com cerca de 1.400 espécies o gênero *Psychotria* da família Rubiaceae engloba arbustos e pequenas árvores encontradas em regiões tropicais de todo o mundo. A *P. viridis*, identificada por Ruiz & Pavona, popularmente conhecida como chacrona ou rainha, possui a N-N-dimetiltriptamina (DMT) como principal alcaloide, que atua como agonista serotoninérgico direto dos receptores de serotonina, subtipo 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} (Mckenna, 2004).

A análise dos teores de DMT, THH, HRL e HRM de 33 amostras de *B. caapi* e de 37 amostras de *P. viridis*, obtiveram em média 7,50 mg/g de DMT; 1,0 mg/g de THH; 0,46 mg/g de HRL e 4,83 mg/g de HRM (Callaway, 1999).

Figura 3: Estruturas químicas dos principais alcaloides presentes na ayahuasca: dimetiltriptamina, harmina, harmalina, serotonina e tetrahydroharmina.



Outros trabalhos revelaram que, as concentrações de β -carbolicinas encontradas na *B. caapi* variam de 0,05% a 1,95% de peso seco, enquanto na *P. viridis*, as concentrações de alcaloides ficaram na faixa de 0,10% a 0,66% de peso seco (Mckenna, 1984; Mckenna, 2004, Costa, 2005). Na bebida ayahuasca, os teores de agentes psicoativos são maiores do que aqueles encontrados nas plantas das quais ela é preparada (Mckenna, 2004).

Quimicamente, as β -carbolicinas são compostos indólicos tricíclicos, relacionados biossinteticamente e farmacologicamente com as triptaminas (Figura 3). São prontamente sintetizados via condensação das indolaminas com aldeídos ou alfa-ceto-ácidos e sua biossíntese, muito provavelmente, é realizada por reações similares (Melchior & Collins, 1982).

Frequentemente a hamina está presente em concentrações uniformemente maiores em relação a harmalina, na proporção de 10:1 nas espécies jovens. Já em espécimes com 7 a 9 anos as concentrações da harmalina diminuem bastante. As diferenças nas concentrações e proporções dos alcaloides encontrados nos infusos de ayahuasca provavelmente estão relacionadas com o método de preparação, quantidade e proporção das partes das plantas empregadas em seu preparo, bem como as variedades das espécies utilizadas (Mckenna, 2004; Callaway, 1999).

No Brasil, com o passar dos anos, o consumo dessas bebidas deixou de ser uso exclusivo dos rituais indígenas, expandindo para os centros urbanos na forma de seitas religiosas. Entre elas: Daime ou Santo Daime, União do Vegetal, Barquinha e outras denominadas gnósticas. Ao contrário do que ocorre nas comunidades indígenas, onde apenas um pequeno percentual de indivíduos consome a bebida regularmente, os grupos religiosos tem por base o consumo regular por todos os membros da comunidade, dentro do contexto cerimonial (Callaway, 1999).

No dia 04 de novembro de 2004, através da Resolução nº 4 do CONAD – Conselho Nacional Antidrogas, o uso da ayahuasca para fins religiosos foi reconhecido como legítimo (Conselho Nacional Antidrogas, 2004) (Pires, 2010). Embora seu consumo seja permitido dentro do contexto religioso, as duas plantas: *B.caapi* e *P. viridis*, não figuram nas listas de substâncias controladas, sendo possível inclusive adquiri-las através da internet e outras fontes (Pires, 2010). O misticismo que envolve as raízes de seu uso e as sensações narradas por viajantes estrangeiros na Bacia do Amazonas só tem contribuído para despertar a imaginação das pessoas, que ficam sedentas dessa nova experiência (Mckenna, 2004).

Do ponto de vista toxicológico, os estudos existentes ainda não são suficientes para se descartar a possibilidade de efeitos nocivos aos usuários, principalmente para crianças, gestantes e pessoas idosas. A tolerância pode ser

observada após o uso regular, porém ainda não foi constatado potencial para indução de dependência. Ao contrário, possíveis aplicações terapêuticas tem sido sugeridas como adjunto no tratamento da dependência ao álcool e de outras drogas de abuso, tratamento do câncer e outras desordens (Grob *et al*, 1996; Mckenna *et al*, 2004).

Considerando o potencial farmacológico dos princípios ativos da ayahuasca, este trabalho tem como objetivo contribuir para a avaliação de algumas propriedades farmacológicas dessa bebida, através de uma triagem em alguns modelos experimentais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico da ayahuasca no CPQBA

A divisão de farmacologia e toxicologia (DFT) do CPQBA, foi convidada a participar de um projeto sobre a farmacologia humana da hoasca (ayahuasca) organizado pela União do Vegetal (UDV). Desse projeto participaram pesquisadores de diversas instituições científicas do Brasil, Estados Unidos da América e Finlândia. Em meados de 1993 esse grupo deu início aos trabalhos em reunião no Núcleo Caupurí da UDV em Manaus para avaliar o uso contextual da ayahuasca. Foram realizados estudos fitoquímicos, botânicos, clínicos, psiquiátricos e de toxicidade em animais de laboratório. O coordenador da DFT, João Ernesto de Carvalho participou dessa reunião onde pôde acompanhar todo o processo de obtenção da ayahuasca, desde a coleta do material vegetal até a obtenção do decocto final.

Para a produção do decocto foram coletados 147 Kg de caule da *Banisteriopsis caapi* (mariri) e 8 Kg de folhas *Psychotria viridis* (chacrona). Após seu desfibramento, o mariri foi intercalado com as folhas da chacrona em diversos galões, adicionada água fervente (600 L.), cuja fervura foi mantida em fogões a lenha até a redução do volume para 120 litros. A dosagem dos compostos ativos realizada por cromatografia líquida de alta eficiência revelou a presença de harmina (1,7 mg/ml), harmalina (0,2 mg/ml), tetrahydroamina (1,07 mg/ml) e dimetiltryptamina (0,24 mg/ml) no produto final (McKenna et al, 1998).

Além da obtenção de material para estudos no CPQBA, o pesquisador pode também experimentar os efeitos dessa bebida em duas cerimônias realizadas nas sedes da UDV em Manaus. Na primeira oportunidade constatou as alucinações visuais e auditivas que sempre vem acompanhadas de intensa náusea. Na segunda oportunidade, acometido de intensa lombalgia, teve a dor eliminada pelo período relativo ao efeito da bebida, por volta de quatro horas. Nessa ocasião a ação analgésica, também na presença de náusea, foi acompanhada por movimentos involuntários do braço. Também pode observar a variabilidade de

efeitos produzidos por essa bebida entre os diversos participantes. A maioria relatou efeitos positivos, mas alguns participantes relataram efeitos extremamente desagradáveis, com crise de ansiedade. Isso reflete a multiplicidade de ações que os princípios ativos da ayahuasca podem exercer sobre o sistema nervoso central e periférico, relacionados ao estado emocional e neurológico de cada indivíduo.

No CPQBA a ayahuasca foi liofilizada e armazenada a -20°C para melhor preservação dos seus princípios ativos. Além da bebida foram obtidos extratos hidroalcoólicos das amostras das duas espécies utilizadas para a obtenção do decocto. A administração por via oral de 500mg/kg da ayahuasca produziu, após vinte minutos, tremores em repouso, inclusive de cabeça, hipertonicidade muscular, efeito do tipo “Straub”, abdução das patas posteriores e hiper-reatividade (Carvalho et al 2004). Pela via intraperitoneal esses efeitos foram mais intensos sugerindo o estudo em modelos de convulsão. Nessa dose e via de administração, em modelo de convulsão por pentilenotetrazol (85 mg/kg), a ayahuasca diminui o tempo de latência para convulsões em 50%, aumentando também em 50% o número de convulsões tônicas e em 60% a letalidade. Na dose de 300 mg/kg não houve alteração do tempo de latência, mas na incidência de convulsões tônicas e letalidade. Já a dose de 100 mg/kg não produziu alterações. No modelo de convulsão por pilocarpina, nas doses de 300 e 500 mg/kg, a ayahuasca não alterou o tempo de latência para as convulsões, mas aumentou de 28% (controle) para 44 e 79% o índice de letalidade, respectivamente. Esses efeitos foram reproduzidos pelo extrato hidroalcoólico da *B. caapi*, e pela harmina (Sigma) confirmando que essas convulsões foram produzidas pelas β -carbolinas presentes na ayahuasca (Kohn et al, 1995).

As β -carbolinas têm como mecanismo de ação a inibição da monoamina oxidase (MAO) e de agonistas inversos no receptor dos benzodiazepínicos. A inibição da MAO provoca aumento de serotonina, dopamina e noradrenalina no sistema nervoso central, provocando efeito antidepressivo, mas diminuindo o limiar de excitabilidade para estímulos convulsivos. A atividade inversa nos receptores de benzodiazepínicos provoca efeito ansiogênico, que também reduz o limiar para convulsões e justifica as crises de ansiedade relatada por alguns dos

usuários da ayahuasca (McKenna, 2004). O aumento de dopamina no sistema nervoso central, em conjunto com as ações alucinogênicas da dimetiltryptamina, também pode estar relacionado com a ocorrência de crises psicóticas em pacientes que sofrem de esquizofrenia (Pomilio et al, 1999).

2.2. Plantas medicinais e Ayahuasca

A natureza é uma importante fonte de novas moléculas com potencial farmacológico para o tratamento de diversas moléstias e historicamente as espécies vegetais têm papel relevante no desenvolvimento de sofisticados medicamentos. Registros da Mesopotâmia que datam de 2600 a.C. documentam o uso de milhares de plantas e derivados, e muitos desses registros até hoje ainda são utilizados na medicina para tratar tosse, resfriados, infecções e inflamações, dentre outras. Além do desenvolvimento de fármacos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 65% da população mundial dependem de plantas tradicionais para os cuidados primários de saúde. No entanto, em países desenvolvidos os produtos naturais também desempenham papel importante na promoção e manutenção da saúde (Cragg e Newman, 2005).

O interesse na pesquisa de novas substâncias ativas de origem vegetal tem aumentado significativamente, pois empresas privadas e organizações governamentais têm instituído projetos de pesquisa nesta área. É importante salientar que na década de 70, nenhuma das 250 maiores companhias do ramo farmacêutico do mundo mantinha qualquer programa de pesquisa na área de produtos naturais, mas essa característica foi mudando e em 2005, pelo menos metade destas empresas havia introduzido este tipo de pesquisa como uma de suas prioridades (Fellows, 1995; Cragg e Newman, 2005).

No que tange ao desenvolvimento de medicamentos, este contexto é particularmente relevante uma vez que as plantas medicinais constituem uma rica fonte de novas moléculas a serem exploradas tanto como drogas convencionais quanto como ferramentas bioquímicas para a elucidação de aspectos etiológicos

de determinadas patologias (Lewis e Hanson, 1991). Outro aspecto importante é a obtenção de compostos que, apesar de apresentarem potencial terapêutico limitado, podem ser utilizados como matéria prima inicial para obtenção de produtos semissintéticos com atividade farmacológica mais pronunciada (Cordel et al, 2000).

Nesse contexto a década de 1990 registrou um aumento expressivo no interesse em drogas derivadas de espécies vegetais evidenciado pelo crescimento de publicações dessa linha de pesquisa nas principais revistas científicas das áreas de Química e Farmacologia (Rates et al, 1994; Calixto et al, 2003). A pesquisa com plantas que são empregadas na medicina popular é, portanto, uma das mais lógicas e produtivas maneiras de pesquisar uma nova droga para uso terapêutico (Elizabetsky et al, 1995).

Neste contexto, considerando a quantidade de compostos presentes na ayahuasca e o potencial terapêutico dos mesmos (advindo das propriedades alucinógenas), as espécies *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* podem ser consideradas fontes promissoras moléculas biologicamente ativas.

2.3. As Religiões

No fim da década 30, formaram-se as chamadas religiões ayahuasqueiras, como Santo Daime, a Barquinha e a União do Vegetal (UDV), atualmente presentes em praticamente todo território nacional e também em outros países como Espanha, Itália, Holanda, França (Costa, 2005).

Esses diversos grupos religiosos possuem influência do catolicismo europeu, religiões africanas e espiritismo, associados a conhecimentos botânicos de pajés de diversas tribos indígenas formando um sincretismo religioso (Labate & Araújo, 2002). Entretanto, cada uma possui particularidades próprias que acabam por diferenciá-las, muito embora o preparo do chá, a cerimônia e as regras para a adesão dos membros sejam bastante similares (Franco & Conceição, 2004).

O ritual de preparo do decocto tem início sempre na última lua nova do mês, durante o final de semana, quando então é feita a limpeza das plantas. Somente aqueles que já possuem conhecimentos da “ciência” da produção e que obtiveram, em “miração” (estado visionário produzido pela ingestão da bebida), a “permissão”, pode participar da preparação da bebida. Uma vez obtida a “permissão divina”. O indivíduo pode iniciar a busca pela árvore que produz a “planta macho” (cipó), *Banisteriopsis caapi* (Costa, 2005).

A seguir é necessário coletar as folhas da chacrona ou rainha (planta fêmea), mas com muito cuidado, pois nem todas as folhas são adequadas: as chamadas folhas frias, mesmo pertencendo ao grupo da chacrona, não são consideradas boas para se preparar a ayahwasca, pois sendo de outra espécie, devem ser separadas das demais. A seguir, o cipó deverá ser batido com um porrete de madeira, separando ou não o miolo da casca, o que ocasionará sabores diferentes quando da ingestão do chá (Costa, 2005).

Figura 4: Preparo do cipó + folhas (sempre alternados). Fotografia obtida pelo Dr. João Ernesto de Carvalho, durante o preparo da ayahwasca na UDV-Manaus)



Figura 5: Preparo na comunidade. Fotografia obtida pelo Dr. João Ernesto de Carvalho, durante o preparo da ayahuasca na UDV-Manaus



Figura 6: Preparo Mariri e Chacrona. Fotografias obtidas pelo Dr. João Ernesto de Carvalho, durante o preparo da ayahuasca na UDV-Manaus.



Esse processo é realizado pelos homens enquanto os mesmos entoam cânticos. O próximo passo é a triagem das folhas “machucadas”, conservando as sadias, que serão utilizadas no preparo do chá. Essa etapa é realizada pelas mulheres, que também entoam cânticos enquanto o fazem. Depois do cipó separado em fibras e da seleção das folhas, ambos serão submetidos à fervura em água e, segundo alguns membros da seita, até mesmo o tipo de madeira para a queima são conhecimentos essenciais no processo. (Franco & Conceição, 2004). Qualquer pessoa pode se tornar adepta. Homens, mulheres, crianças idosos, grávidas, não há restrição alguma de sexo ou idade para ingestão do chá (Pires, 2010).

Os grupos Alto Santo e CEFLURIS preservam o caráter sagrado da festa e da dança oriundos do catolicismo popular, sendo que suas divindades são: Deus, Jesus, a virgem Maria, os santos católicos, entidades oriundas do universo afro-brasileiro e seres da natureza (sol, lua, estrela). O núcleo do ritual consiste em entoar coletivamente os hinos e dançar o bailado alternado com períodos de silêncio e meditação. O calendário de “trabalhos”, forma pela qual é conhecida a cerimônia, ocorre em datas pré-determinadas por cada grupo, geralmente duas vezes no mês e em vésperas ou no próprio dia de diversos santos diferentes conforme a seita. Existem missas especiais para os mortos e também missas de cura (Pires, 2010).

A principal diferença entre o Alto Santo e o CEFLURIS, diz respeito à possessão, permissão para incorporar entidades, fruto da influência umbandista, que vem sendo amplamente aceita pelo CEFLURIS e é totalmente proibida no Alto Santo (Labate & Araújo, 2002).

A distribuição da bebida sempre é realizada por um ou mais responsáveis e, no final do ritual ocorrem as orações “Pai Nosso” e “Ave Maria”. Também há um espaço para que os presentes se assim o desejarem manifestem sua experiência daquele dia com relação ao trabalho. Um lanche ou refeição encerra a noite de comunhão (Franco & Conceição, 2004).

A Barquinha é por sua vez a linha mais eclética das três religiões e sem dúvida a que possui maior influência da umbanda. Nas cerimônias, após a ingestão do chá ocorrem as incorporações de entidades espirituais que expressam os três planos cosmológicos: o astral, a terra e o mar. A barca representa a missão deixada por Frei Daniel e também a viagem de cada indivíduo dentro da trajetória de vida de cada um. O calendário das atividades é o mais extenso e a diversidade dos trabalhos a mais ampla, não sendo raro o consumo da bebida quatro vezes por semana (Labate & Araújo, 2002; Pires et al, 2010).

A União do Vegetal possui em comparação aos demais, um ambiente despojado de signos religiosos populares, tais como velas, imagens de santos, etc. Mais do que devoção, hinos ou preces, o trabalho está voltado para a concentração mental. Possui forte relação com o espiritismo Kardecista, através de conceitos como evolução espiritual, reencarnação e busca do estado de perfeição do espírito. Possui influência cristã, porém menos evidente, sendo que as figuras de Jesus Cristo e Virgem Nossa Senhora têm lugar de destaque. Durante os trabalhos, existe uma série de histórias, parábolas, que foram deixadas pelos fundadores e que trazem personagens tais como Iemanjá, Salomão e Samaúma (Labate & Araújo, 2002; Pires et al, 2010).

O uso da bebida por seus membros é visto como uma forma de atingir um estado de êxtase e lucidez espiritual. O Mestre dosa, segundo sua impressão, a quantidade que cada indivíduo deve receber, não excedendo um copo americano (150 a 200 mL) (Labigalini, 1998). Os usuários experientes têm muito cuidado na escolha das pessoas e do local onde é realizado o ritual (Labigalini, 1998; Costa, 2005). Os indivíduos iniciantes ou pouco conhecidos pelo grupo são acompanhados de um usuário experiente que geralmente realiza uma preleção coletiva com a finalidade de atenuar ao máximo a possibilidade do surgimento de reações adversas e para proteção da experiência grupal (Labigalini, 1998).

Segundo Mckenna (2004) a grande maioria dos membros da UDV possui melhor nível de educação e classe social em relação aos membros das demais

vertentes. Dos 7000 membros da UDV, em torno de 10% são médicos de diferentes especialidades. Esses profissionais têm interesse profundo no conhecimento científico da ayahuasca, simultaneamente nutrindo dedicada devoção espiritual.

2.4. Aspectos Farmacológicos da Ayahuasca

2.4.1. Principais Efeitos da Ayahuasca

Através da ingestão de uma dose média de ayahuasca, usualmente 150 ml, são relatados os seguintes efeitos no plano psíquico: profundas e rápidas alterações dos estados emocionais, o indivíduo vai da depressão a euforia em poucos segundos, pânico, apatia, alterações na memória e no pensamento, despersonalização e hiper-sugestionabilidade, aparecimento de objetos que vibram e aumentam sua luminosidade; figuras que se movem rapidamente e cenas emergem visíveis com os olhos abertos ou fechados (conhecido como estado visionário) e perda da habilidade de falar coerentemente (Gable, 2007).

Também são descritos por Riba *et al.* (2003) sensações de bem-estar, podendo ser acompanhado por sentimentos de terror e choro implorando por perdão. No plano perceptivo-sensorial: distorções de tempo e espaço, estranhas sensações corporais, alterações nas percepções de formas, cores, sons, sinestésias e alucinações com alterações auditivas, olfativas e visuais. (Shanon, 2002).

Certas β -carbolinas foram identificadas como causadoras de efeitos comutagênicos e o mecanismo parece estar associado à interação destas substâncias com os ácidos nucleicos (Mckenna *et al.*, 1998). Essas substâncias, por serem inibidoras da MAO, podem causar a denominada síndrome serotoninérgica (Sanders-Bush e Hazelwood, 2007), que é um dos efeitos mais graves ocasionados pelo excesso de serotonina (Mckenna *et al.*, 1998).

Os efeitos subjetivos similares podem ser exemplificados na área somática por náuseas, vômitos, tremores, tonturas, debilidade, contratura muscular, hiperreflexia e dores generalizadas (Callaway, 1999). Embora os agentes psicodélicos atuem nos mesmos receptores, com similares mudanças somáticas, psíquica e perceptivo-sensoriais, não são fatores determinantes das características da “viagem psicodélica “. Ainda, segundo esse autor estas substâncias apenas seriam responsáveis pela abertura da mente a outras formas de percepção da realidade.

A avaliação de intensidade de efeitos da ayahuasca foi realizada através da aplicação da Escala de Mensuração dos alucinógenos (Hallucinogen Rating Scale [HRS]), aproximadamente uma hora depois de cessados os efeitos da ingestão de cerca de 150 mL do chá (Labigalini, 1998). Foram encontrados resultados semelhantes a uma dose intravenosa de 0,1 a 0,2 mg/kg de DMT nos espectros de intensidade, afeto, cognição e volição (Labigalini, 1998). No agrupamento de percepção, foi comparável com 0,1 mg/kg de DMT e no agrupamento de sinestesia foi inferior à menor dose de DMT intravenosa utilizada (0,05 mg/kg) (Labigalini, 1998; Costa, 2005).

Efeitos pós-uso também são observados com essas substâncias. Dentre os mais divulgados e raros se encontram a denominada psicose persistente alucinógeno-induzida e o distúrbio persistente de percepção alucinogênica, ambos apresentando persistência de aspectos agudos específicos da experiência por longos períodos de tempo. O primeiro desses distúrbios apresenta um componente afetivo com mudanças de humor repentinos, variando de mania a depressão profunda, pensamentos religiosos, distúrbios visuais vívidos, e alucinações não típicas da esquizofrenia (isto é, ausência de alucinações auditivas de conversação, comentários ou vozes de comando) (Escobar, 2010).

Segundo alguns autores, o provável potencial terapêutico da ayahuasca está diretamente ligado ao conceito da cura espiritual. Engloba mudanças de personalidade, nas relações do indivíduo com seu próprio corpo, auto reavaliação

do seu papel profissional, e por fim, mudanças na relação do indivíduo com a sociedade e com a natureza. Entre os pretendidos efeitos terapêuticos da ayahuasca estão os tratamentos da dependência ao álcool e de outras drogas de abuso. Também foi constatada a melhora no quadro de indivíduos que possuíam um déficit no sistema serotoninérgico (Pelaez, 2004).

Num recente estudo realizado por Samoylenko et al, (2010), os extratos de *Banisteriopsis caapi* foram testados *in vitro* para inibição das MAOs humanas e atividade antioxidante estabelecendo a correlação entre composição fitoquímica dos extratos e bioatividade. Outro estudo relacionou a inibição da MAO pela harmina e harmalina e a neurodegeneração com potencial terapêutico para o tratamento da doença de Parkinson (Schwarz et al, 2003).

Evidências pré-clínicas indicaram que os receptores 5-HT_{2a}/5-HT_{2c} tem o potencial farmacoterapêutico para dependentes de cocaína em diferentes situações, mas ainda são necessários estudos para determinar a eficácia de atuação nesses receptores (Brierley, 2012).

2.4.2. Farmacocinética da Ayahuasca

Em estudo clínico conduzido por Riba *et al.* (2012), cápsulas liofilizadas de ayahuasca foram administradas em doses de 0,6 e 0,85 mg de DMT/Kg em oito voluntários com histórico prévio de uso de psicodélicos. A ayahuasca produziu efeitos entre 1.5 a 2 horas após a ingestão. A concentração plasmática máxima de DMT após a menor e a maior dose foi de 12,14 ng/ml e 17,44 ng/ml, respectivamente. O tempo para obtenção da concentração plasmática máxima (C_{max}) coincidiu com o pico de intensidade de efeitos subjetivos. (Pires, 2010).

Além de ser encontrada em diversas espécies vegetais, a DMT também está presente em tecidos de mamíferos, animais marinhos e anfíbios. Em humanos, está no sangue, urina e no fluído cérebro-espinhal, e, portanto, é uma substância endógena (Strassman, 1994). Logo após a descoberta da DMT endógena, que é gerada a partir do aminoácido essencial triptofano, alguns

autores relataram aumento no nível de DMT em fluidos de pacientes esquizofrênicos (Pires, 2010).

Quando ingerida é totalmente inativada mesmo em doses acima de 1000 mg. Ao contrário, quando inalada ou na forma injetável é capaz de produzir efeitos alucinógenos, quase imediatos. Uma simples inalação produz efeitos que duram em torno de 30 minutos, caracterizada por alucinações multicoloridas (Brito, 2004).

Na forma injetável com doses de 0,2 a 0,4 mg/kg, são observados efeitos quase instantaneamente, sendo que os níveis sanguíneos associados com as visões foram medidos em 32-204 ng/ml. Nas doses de 30-150 mg (0,4 – 2,0 mg/kg) por via intramuscular a DMT foi classificada como extremamente ativa (Ott, 1999). No entanto, quando administrada juntamente com outras substâncias (de origem natural ou sintética) inibidoras da MAO, a DMT promove efeitos psicoativos que se estendem desde alterações perceptuais até mudanças emocionais e cognitivas. As β -carbolinas presentes em espécies de *Banisteriopsis caapi* possuem a capacidade de inibir reversivelmente a enzima monoamino oxidase (MAO), preferencialmente a MAO-A, potenciando os efeitos da DMT (Shanon, 2002).

O tempo para início dos efeitos do decocto é de aproximadamente uma hora após a ingestão. Esses efeitos, que são menos intensos que os produzidos pela DMT parenteral ou pulmonar, aumentam progressivamente até o pico em 01h15min, permanecendo constantes por um período de 45 a 60 minutos que começam a decrescer e desaparecem após 3 a 4 horas (Ott, 1999; Brito, 2004).

Em um estudo clínico utilizando duas doses repetidas de ayahuasca em intervalo de 4 horas, foram encontradas alterações fisiológicas e psicológicas significativas em relação ao placebo, tais como: alteração dos efeitos subjetivos positivos, intensificação dos efeitos psicotrópicos e aumento dos efeitos secundários negativos (atribuídos a aumento nos níveis plasmáticos de DMT); alterações no eletroencefalograma com aumento da atividade cerebral espontânea, principalmente na banda de frequência beta; aumento nos níveis de

prolactina e cortisol e diminuição nos níveis de hormônio de crescimento, este último fenômeno foi atribuído às mudanças nos receptores serotoninérgicos (Santos *et al.*, 2011).

2.4.3. Serotonina e a ansiedade

A 5-hidroxitriptamina (5-HT, serotonina), é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central (SNC), atuando também como regulador da atividade da musculatura lisa nos sistemas cardiovascular e gastrointestinal com duplo papel na regulação do comportamento de defesa. Atua como reguladora da função plaquetária, sendo encontrada em elevada concentração nas células enterocromafins distribuídas pelo trato gastrointestinal, nas plaquetas e em regiões específicas do SNC responsáveis pelo sono e humor (Rang & Dale, 2001).

A síntese da serotonina tem como precursor o triptofano, aminoácido presente na dieta, que é convertido em 5-HT pela ação da enzima triptofano hidroxilase e em seguida a 5-HT é armazenada em vesículas que ao receber um potencial de ação, migram até a membrana do neurônio. A serotonina, após liberada da terminação nervosa, pode ter três caminhos: se ligar aos receptores pós-sinápticos, se ligar aos receptores pré-sinápticos ou ser recaptada. Quando recaptada, a 5-HT pode ser degradada pela monoamino oxidase ou ser reorganizada em vesículas (Bush & Mayer, 2003).

Segundo Graeff e Deakin (1996), a 5-HT possui um papel duplo na ansiedade podendo provocar ações ansiolíticas ou angiogências. As estruturas envolvidas na ansiedade são a amígdala (sistema de defesa) e o hipocampo (processa emoções). A serotonina quando liberada das terminações nervosas do núcleo da rafe dorsal aumenta a ansiedade e quando liberada da matéria cinzenta periaquedutal diminui a ansiedade, inibindo o medo. As respostas mediadas pela serotonina teriam, portanto, um sentido adaptativo, já que para níveis de perigo

potencial ou distal é conveniente que os comportamentos de luta e fuga sejam inibidos, possibilitando que o indivíduo adote estratégias mais adequadas, como exploração cautelosa e inibição comportamental.

A 5-HT possui sete tipos de receptores (5-HT₁₋₇) com subtipos (A-D), acoplados à proteína G, exceto o 5-HT₃ que é um canal iônico. Conforme o tipo de receptor existente no tecido, a 5-HT exercerá diferentes ações. Estudos preliminares indicam que as múltiplas ações da 5-HT podem ser explicadas por uma interação com mais de um subtipo de receptor simultaneamente (Sanders-Bush e Hazelwood, 2007).

O receptor 5-HT_{1a} encontra-se distribuído pelos núcleos da rafe e hipocampo, e quando ativado inibe a produção de AMP-cíclico (AMPc). O 5-HT_{1b} aparece no globo pálido e gânglios da base e sua estimulação também leva à diminuição do AMPc. O receptor 5-HT_{1c} ocorre na coróide e hipocampo gerando aumento do trifosfato de inositol (IP₃) nesses locais (Costa, 2005). Os receptores 5-HT_{1c} e 5-HT₂ encontram-se nas plaquetas, músculo liso, córtex cerebral e fundo de estômago, produzindo também aumento do IP₃. Esse aumento do IP₃ tem como consequência elevação da secreção e motilidade desses órgãos e tecidos, justificando alguns dos efeitos observados tais como vômito e diarreia (Sanders-Bush e Hazelwood, 2007).

Do ponto de vista metabólico, após a inibição da monoamino oxidase, os níveis de 5-HT aumentam, estimulando os centros vagais cerebrais e consequentemente as secreções e motilidade do sistema digestivo (Callaway, 1994; Costa, 2005).

Os receptores 5-HT₃ estão presentes no sistema nervoso periférico, particularmente em neurônios aferentes nociceptivos e entéricos, e os 5-HT₄ principalmente no sistema nervoso entérico. Os efeitos são excitatórios, causando aumento da motilidade intestinal. Pouco se sabe sobre a função e a farmacologia dos receptores 5-HT₅₋₇. (Rang & Dale, 2001).

No sistema cardiovascular a serotonina produz contração da musculatura lisa vascular e agregação plaquetária. Com relação ao músculo liso bronquiolar, possui pequena ação estimulante, não apresentando efeitos significativos sobre a respiração. No sistema nervoso, essa substância estimula as terminações nervosas sensoriais para dor e prurido. (Costa, 2005).

Por serem agonistas serotoninérgicos indiretos, as β -carbolinas aumentam os níveis de serotonina, dopamina, norepinefrina e epinefrina no cérebro, bloqueando a desaminação dessas aminas e promovendo efeitos sedativos primários. Outros efeitos neurofisiológicos das β -carbolinas incluem: inibição competitiva da dopamina, epinefrina e norepinefrina nos sinaptossomas, inibição na síntese de aminas biogênicas e possível atuação nos receptores benzodiazepínicos (Mckenna, 2004; Cazenave, 2000).

No entanto, também se conhece que as β -carbolinas por si só não produzem efeitos visionários, causando apenas sedação, semelhante àquela produzida pelos benzodiazepínicos, razão pela qual as plantas ricas em β -carbolinas são usadas mundialmente como sedativas. Tal fato pode facilmente ser justificado em função da dose, pois as quantidades de β -carbolinas presentes numa dose de ayahuasca estão bem abaixo do limiar de sua atividade alucinogênica própria, que são de 300 a 500 mg para HRL e THH e de 100mg para HRM, porém acima do limiar para atividade como inibidora da MAO. Além disso, uma poção tradicional contém 3 partes de HRM para 1 parte de tetraidroharmina (THH) e apenas traços de HRL (Ott, 1999; Cazenave, 2000; Brito, 2004).

2.4.4. Aspectos Toxicológicos

Efeitos adversos à saúde podem ocorrer a partir do uso casual da ayahuasca quando substâncias serotoninérgicas são utilizadas em conjunto. É fato que a DMT pode induzir episódios psicóticos transitórios, no entanto, se resolvem espontaneamente em algumas horas. Segundo alguns autores, os benefícios psicológicos são registrados a longo prazo dentro de um contexto

religioso, sendo que se tem observado que os usuários dedicados, com o tempo perdem o interesse pelo álcool, tabaco, cocaína entre outras substâncias (Gable, 2006).

A DL_{50} reportada para camundongos, no caso da DMT, foi de 32 mg/kg por via intravenosa. Já as β -carbolinas possuem DL_{50} de 2,0 g/kg, sendo dessa forma, bem menos tóxicas que a DMT do ponto de vista de exposição aguda. A extrapolação dos dados obtidos em camundongos para humanos é bastante comum, principalmente para os dados dose letal média. Quando há ausência de informações sobre a DL_{50} oral de uma substância, como no caso da DMT, deve-se assumir que humanos são 20 vezes mais sensíveis que roedores. Isto resulta numa DL_{50} para humanos de 1,6 mg/kg quando DMT é administrada por via intravenosa, ou seja, 112 mg para um indivíduo com 70 kg (Gable, 2006).

Observa-se que não há evidências de dependência física, mas alguma tolerância pode ser desenvolvida com o uso regular, podendo ocorrer alterações nos níveis de neurotransmissores, principalmente da serotonina (Callaway et al., 1994). A margem de segurança da utilização em uma cerimônia religiosa se compara ao uso da codeína, mescalina ou metadona. De acordo com Gable (2006), o potencial de dependência oral do DMT e perturbação psicológica são mínimos.

Existe a hipótese de que se a dieta do indivíduo for rica em tiramina e simultaneamente foi feita a ingestão da ayahuasca, pode existir risco potencial de efeito adverso hipertensivo (Brito, 2004).

Estudo avaliando os efeitos teratogênicos relatou a DMT administrada em ratas prenhas durante o período de organogênese resultou em alguns efeitos tóxicos como diminuição da capacidade reprodutiva (Halky, 1974). Apesar de Oliveira et al (2010) contestarem os dados acima em virtude das doses elevadas utilizadas esse efeito adverso não deixa de ser preocupante e exige estudos aprofundados para identificação do mecanismo de ação tóxica e, principalmente, se é reversível. Outros estudos relataram que doses elevadas de harmalina

produziram neurotoxicidade em ratos, com degeneração das células de Purkinje no cerebelo, reforçando a necessidade de estudos de toxicidade (Miwa, 2006).

3. Objetivos

3.1. Geral

Este trabalho teve por objetivo realizar uma triagem farmacológica da ayahuasca em modelos de ansiedade, nocicepção e proliferação celular.

3.2. Específicos:

- Avaliar os efeitos da ayahuasca sobre a proliferação das linhagens tumorais humanas de mama (MCF-7), rim (786-0), pulmão (NCI-H460), próstata (PC-3), ovário (OVCAR-3), cólon (HT-29) e ovário resistente a múltiplas drogas (NCI-ADR)
- Avaliar a atividade antinociceptiva (placa quente e contorção abdominal) da ayahuasca em camundongos;
- Avaliar os efeitos ansiolíticos da ayahuasca em ratos *Wistar* nos modelos de labirinto em cruz elevado e campo aberto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Processamento Fitoquímico

Neste trabalho a Ayahuasca (extrato bruto aquoso – EB) foi preparada na sede da UDV- Manaus, por decocção de 147 kg *Banisteriopsis caapi* (Mariri) e 8 kg de folhas *Psychotria viridis* (Chacrona), ambas recém-coletadas, em 600 L de água. Deste total foram fornecidos pela UDV um litro que posteriormente foi liofilizado para ser utilizado nos experimentos.

4.2. Farmacologia e Toxicologia

4.2.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* (150 – 250g) machos e camundongos *Swiss* (25-35g) machos, vindos do Centro Multidisciplinar para Investigação biológica (CEMIB) da UNICAMP, que foram mantidos no biotério da Divisão da Farmacologia e Toxicologia do CPQBA sob condições de temperatura controlada (temperatura 23 + 1°C, umidade 60-65% e ciclo regular claro/escuro com iluminação artificial entre 07:00 e 19:00h. Todos os animais receberam padrões de dieta e água *ad libitum* do laboratório. Os experimentos foram conduzidos durante as fases do ciclo claro, entre 08:00 e 12:00h.

Os experimentos realizados neste trabalho foram interpretados de acordo com as recomendações da SBNeC (Brazilian Condition Society for Neuroscience and Behavior), que foi baseado na US National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals. Todo esforço foi feito para minimizar o número de animais e seus sofrimentos, aprovado pelo comitê de ética sob protocolo 3105-1.

4.2.2. Drogas e Reagentes

Cloreto de sódio (Labsynth- Brasil) e ácido acético glacial (Chemco- Brasil), fentanil (Janssen - Farmacêutica), soro fetal bovino (Gibco®), Sulforrodamina B (Sigma-Aldrich®), Ácido tricloroacético (Sigma-Aldrich®) e trizma-base (Sigma-Aldrich®).

4.2.3. Avaliação da toxicidade aguda – via intraperitoneal e oral

Grupos experimentais de 6 camundongos (*Swiss*) foram tratados pela via intraperitoneal (i.p.) com ayahuasca nas doses 100, 300, 500, 1000 e 2000 mg/kg. Foram então colocados em uma caixa para que se pudesse avaliar efeitos gerais produzidos por essa bebida durante um período de 4 horas (Carlini, 2011). Com o mesmo objetivo, mas com tratamento pela via oral, outro três grupos (100, 300 e 500 mg/kg) foram tratados.

4.2.4. Atividade antiproliferativa em linhagens tumorais

O laboratório da divisão Farmacologia e Toxicologia do CPQBA possui uma área desenvolvida para cultura de células tumorais, com um painel de linhagens tumorais *in vitro*, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI/EUA).

4.2.4.1. Análise da atividade em cultura de células tumorais humanas

A fim de evitar contaminação e garantir a viabilidade celular, os testes foram realizados sob condições assépticas em ambiente controlado de fluxo laminar biológico, utilizando materiais e reagentes esterilizados de acordo com a natureza de cada um. As linhagens estão relacionadas na tabela 1.

4.2.4.2. Cultivo celular

As células foram cultivadas em frascos de 25 cm² (T25) com 5 mL de meio RPMI 1640 (Gibco®), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB-Gibco®) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Durante os experimentos, uma solução de penicilina:estreptomicina (1000 U/mL:1000 µg/mL, 1 mL/L RPMI 1640) foi adicionada ao meio de cultura.

Para linhagens aderidas, o desprendimento celular foi realizado mediante ação enzimática da tripsina. Para tanto, o meio de cultura foi aspirado, o frasco lavado com 500 µL de tampão fosfato (PBS, pH 7,0) para eliminar resíduos de meio de cultura e, após aspiração do tampão, foram adicionados 500 µL de tripsina-EDTA 2,5 g/L (Vitrocell®), a 37°C, até que as células se soltassem totalmente. A ação da tripsina foi bloqueada com RPMI + SFB 5% e uma alíquota dessa suspensão foi transferida aos novos frascos, completando-se o volume para 5 mL.

Tabela 1- Linhagens celulares empregadas na avaliação de atividade antiproliferativa.

Linhagem	Órgão; doença
MCF-7	Mama; adenocarcinoma
NCI-ADR/RES *	Ovário; adenocarinoma
786-0	Rim; adenocarcinoma
NCI-H460	Pulmão; carcinoma
PC-3	Próstata; adenocarcinoma
OVCAR-3	Ovário; adenocarcinoma
HT29	Cólon; adenocarcinoma

* esta linhagem apresenta resistência a múltiplos fármacos

4.2.4.3. Preparo das suspensões celulares

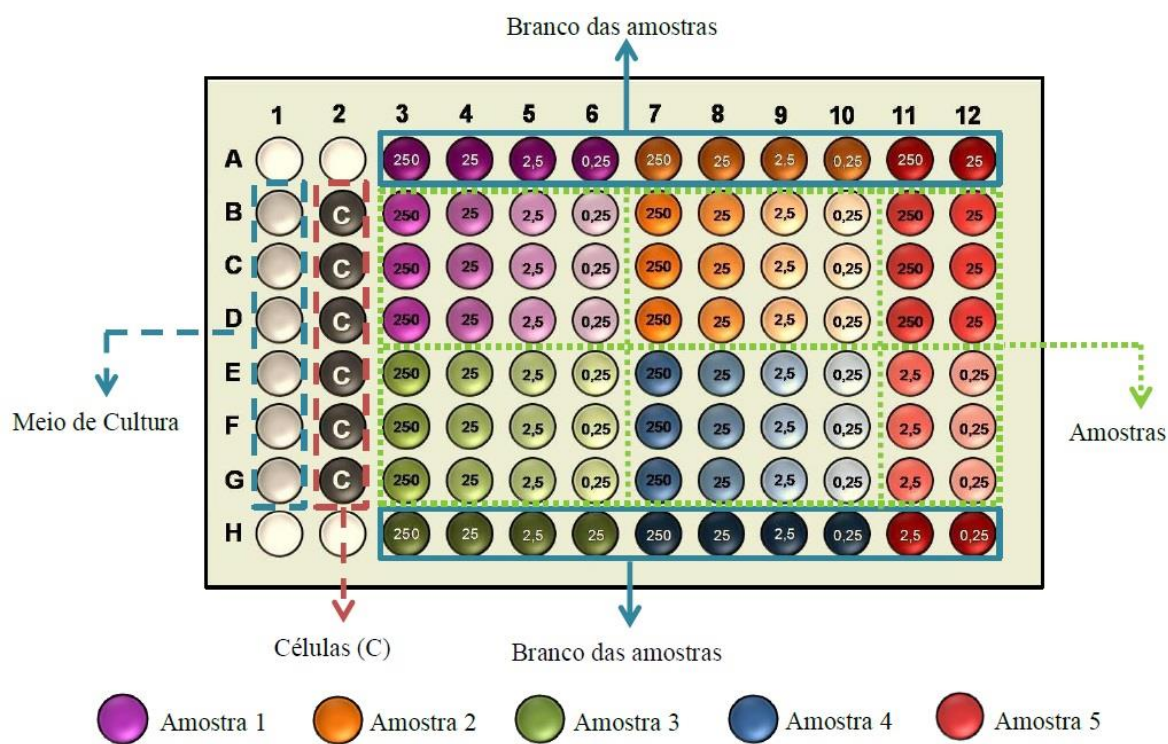
O crescimento celular foi determinado por espectrofotometria, utilizando-se o corante proteico sulforrodamina B (SRB, Sigma-Aldrich®) e as análises foram baseadas na metodologia de triagem *in vitro* para drogas anticâncer realizada pelo NCI, EUA, que utiliza um painel de 60 linhagens tumorais humanas (NCI60) (Monks *et al.*, 1991; Shoemaker, 2006). De modo diferente de outros métodos, este protocolo inclui a determinação da densidade celular no tempo 0 (momento de adição das amostras), o que possibilita o cálculo da concentração que inibe totalmente o crescimento celular (Shoemaker, 2006).

No primeiro dia de experimento, as suspensões celulares foram preparadas com meio RPMI com 5% de SFB e penicilina-estreptomicina (2 mg/L). Foram inoculados 100 µL/compartimento de cada suspensão celular em placas de 96 compartimentos, que foram incubadas por 24 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e ambiente úmido. Da mesma forma, preparou-se uma placa controle (placa T0), contendo todas as linhagens celulares utilizadas no experimento.

4.2.4.4. Preparo e aplicação das amostras

A ayahuasca foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck®) na concentração de 0,1 g/mL. Para a adição à cultura de células, estas soluções foram diluídas pelo menos 400 vezes em meio de cultura RPMI com 5% de SFB e penicilina:estreptomicina (2 mg/L), o que evitou a toxicidade do DMSO. A ayahuasca foi adicionada nas microplacas (cinco amostras por microplaca) nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata e, a seguir, foram incubadas por 48 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ambiente úmido (*Figura 6*). Como controle positivo, utilizou-se o quimioterápico doxorrubicina, nas concentrações de 0,025; 0,25; 2,5 e 25 µg/mL (100 µL/compartimento) em triplicata.

Figura 7: Representação gráfica da distribuição das amostras na placa de 96 compartimentos utilizada no teste de atividade antiproliferativa.



No momento de adição das amostras, as células inoculadas na placa controle T0 foram fixadas com a adição de 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético (TCA) a 50% (Sigma-Aldrich®) para determinação da quantidade de células presentes, sendo este o valor basal (tempo 0). Após 48 horas de tratamento, as células foram fixadas com 50 μ L/compartimento de ácido tricloroacético a 50% (TCA) e incubadas por 1 hora, a 4°C. Em seguida, as placas foram submetidas a quatro lavagens consecutivas em água corrente para a remoção dos resíduos de TCA, meio, SFB e metabólitos secundários. A seguir foram mantidas à temperatura ambiente até a secagem completa.

Após a secagem, foram adicionados 50 μ L/compartimento do corante proteico sulforrodamina B (SRB) (Sigma-Aldrich®) a 0,4 % (p/v) dissolvido em ácido acético a 1 % (v/v) e, a seguir, as placas foram incubadas à temperatura ambiente, por 10 minutos. As placas foram então lavadas por 4 vezes

consecutivas com solução de ácido acético 1% (v/v) e, após secagem completa à temperatura ambiente, o corante ligado às proteínas celulares foi solubilizado com 150 µL/compartimento de Trizma Base (10 µM, pH 10,5) (Sigma-Aldrich®). A leitura espectrofotométrica da absorbância foi realizada em leitor de microplacas a 540 nm (Molecular Devices®, modelo VersaMax).

4.2.4.5. Análise dos resultados

As médias das absorbâncias foram calculadas descontando o valor de seus respectivos brancos e, através das fórmulas a seguir, foi determinado o crescimento celular (em porcentagem) de cada linhagem celular em função das concentrações de cada amostra testada.

Se $T > C$, a amostra estimulou o crescimento.

Se $T_0 \leq T < C$, a amostra foi citostática e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (C - T_0)]$.

Se $T < T_0$, a amostra foi citocida e a fórmula utilizada foi $100 \times [(T - T_0) / (T_0)]$.

Sendo T a média das absorbâncias das células tratadas, C o controle de células e T₀ a média das absorbâncias das células no tempo 0. Esses resultados foram expressos em curvas de crescimento celular para cada linhagem em função da concentração da amostra e, a partir deles, foram calculadas as concentrações efetivas TGI (*Total Growth Inhibition*, concentração necessária para inibição total de crescimento celular) e GI₅₀ (concentração necessária para inibição de 50% da viabilidade celular), através de regressão não linear, tipo sigmoidal, empregando-se software ORIGIN 8.0 (OriginLab Corporation).

4.2.5. Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

Grupos experimentais de até 8 camundongos (*Swiss*) foram tratados por via intraperitoneal com a ayahuasca nas doses de 300 e 500 mg/kg e salina 0.9%. Após 30 minutos, os animais receberam ácido acético (0,8% 0,1 mL/ 10g, i.p) e após 5 minutos foram realizadas as contagens do número de contorções da parede abdominal durante 15 minutos como indicativo de nocicepção (Koster et al., 1959).

4.2.6. Teste de algesia induzida por calor (Placa quente)

Grupos experimentais de 10 camundongos (*Swiss*) foram tratados pela via intraperitoneal com solução de NaCl 0,9% (controle negativo), fentanil (0,3mg/kg/controlado positivo) e com a ayahuasca nas doses 100, 300 e 500 mg/kg, trinta minutos antes da administração do estímulo álgico.

Após 30, 60, 90 minutos desta administração, os animais foram submetidos ao estímulo álgico em placa quente com temperatura controlada de $56 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, até que apresentasse o reflexo doloroso (lamber as patas dianteiras e/ou traseiras) sendo anotado o tempo de reação dos animais com uso de cronômetro acoplado à placa quente. Para este teste, os camundongos foram previamente submetidos ao estímulo álgico (24h antes) a fim de eliminar os animais muito ou pouco responsivos (D'amour and Smith, 1941, Woolfe et al., 1944).

4.2.7. Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O labirinto em cruz elevado foi produzido em madeira, de acordo com as especificações de Pellow et al. (1985). O aparato consiste em dois braços abertos (50 x 10 cm) e dois braços fechados do mesmo tamanho com 40 cm de altura, elevado 50 cm do chão. Para evitar que ratos possam cair, uma borda do Plexiglas 1 cm de altura foi feita para cercar os braços abertos.

Os ratos adultos da linhagem *Wistar* foram divididos em quatro grupos experimentais (n=10). Um grupo foi tratado com NaCl 0,9% e outro ayahuasca

(1000 mg/kg, v.o) foram avaliados após tratamento com uma única dose. Outros dois grupos (salina e ayahuasca 1000 mg/kg) foram tratados a cada dois dias por duas semanas. Vinte minutos após o último tratamento os animais foram colocados no centro do LCE e observados durante cinco minutos.

As sessões experimentais foram registradas por uma videocâmara montada verticalmente, acoplada a um monitor e utilizando lâmpada vermelha de 60-Hz em ambiente com baixa luminosidade. Para cada animal, o total de números de entradas (braços aberto + fechado), a percentagem de entrada no braço aberto ($100 \times \text{entrada}/\text{total}$) e a percentagem do tempo permanência no braço aberto [$100 \times \text{aberto}/(\text{aberto}+\text{fechado})$] foram calculadas. Depois de cada triagem, o aparato era desinfetado com solução de etanol a 10%.

Um aumento da percentagem do tempo de permanência nos braços abertos é considerado reflexo do efeito ansiolítico, enquanto o número de entradas nos braços fechados fornece uma medida da atividade geral (File, 1992 e Pellow et al., 1985).

4.2.8. Teste do Campo Aberto (Open Field)

O equipamento para teste de atividade em campo aberto é confeccionado em acrílico branco (72 cm diâmetro, 60 cm de altura). O piso apresenta dois círculos concentrados divididos em 12 segmentos de área igual por linhas diante do centro (retângulos medindo 13,3 por 15.0 cm).

Imediatamente após a avaliação no labirinto em cruz elevado, cada animal foi colocado individualmente no centro do campo aberto e seu comportamento foi registrado através de uma filmadora (File, 1992 e Pellow et al., 1985).

Durante 5 minutos de ambulação espontânea, foram observados e analisados os seguintes parâmetros: o número de cruzamentos com as quatro patas das áreas demarcadas (retângulos), o número de autolimpeza, o número de

levantamentos e números de bolos fecais. Depois de cada triagem, o aparato foi limpo com solução de etanol a 10%.

Após a realização dos testes, os animais foram anestesiados com mistura de quetamina e xilasina, pela via intraperitoneal, para retirada de sangue do plexo retro orbital com o auxílio de tubo (capilar sem heparina) e determinação de microhematócrito (Perfecta / comprimento 75 mm; Ø interno 1,0 mm; Ø externo 1,5 mm). Amostras de sangue foram analisadas em Analisador Hematológico Veterinário (Beckman-CoulterAcT Diff) e os valores dos grupos tratados foram comparados com os valores obtidos nas análises dos animais dos grupos controle salina e tratado. Diversos autores relatam a importância de utilizar os valores obtidos no grupo controle salina, uma vez que representam o universo de indivíduos da mesma procedência e, principalmente, sob o mesmo sistema de manejo (Evans, 2009).

4.3. Análise Estatística

Neste trabalho, os resultados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA), tendo as diferenças estatisticamente significativas em $p < 0,05$, seguido do teste Duncan, usando o Software Start Soft® e os gráficos foram criados usando o Software Prism®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas alucinógenas são utilizadas pelo homem há muitos séculos, muitas vezes sendo descritas como substâncias inócuas, mas sua natureza imprevisível pode promover intoxicação potencialmente perigosa. No tocante à ayahuasca, atualmente existe um maior acesso como forma de lazer. Os efeitos produzidos pelos princípios ativos da *Banisteriopsis caapi* e da *Psychotria viridis* fizeram com que essas espécies fossem incorporadas pelas tradições espirituais e ritualísticas. No entanto, também resultaram na sua ampla propagação, uso generalizado e muitas vezes abusivo (Cunningham, 2008).

Em 1845, Jacques Moreau publicou o primeiro texto sobre alucinógenos, onde observou que alguns compostos permitiam a transformação de pensamentos em experiências sensoriais. Em 1924, o alemão Louis Lewin, creditado como o pioneiro da investigação científica em toxicologia e psicofarmacologia, escreveu a monografia intitulada “Phantastica – um estudo clássico sobre o uso e abuso de plantas que alteram a consciência”, onde citadas propriedades alucinógenas da ayahuasca (Cunningham, 2008).

A maioria dos alucinógenos contém substâncias nitrogenadas de caráter básico, classificados como alcaloides, sendo que muitos deles têm estruturas químicas similares a neurotransmissores (ex: acetilcolina, serotonina) interagindo com seus receptores e provocando efeitos agonistas ou antagonistas desses transmissores. Apesar da longa história e tradição do uso indígena, poucas informações pré-clínicas e clínicas foram acumuladas especialmente toxicológicas para garantir o uso seguro (Cunningham, 2008).

Nas últimas décadas, o uso da ayahuasca tem se expandido além da cultura indígena e vem sendo utilizado em alguns movimentos religiosos como citado anteriormente (Santo Daime, UDV e Barquinha), que buscam um meio de facilitação do autoconhecimento e introspecção (Labate, 2002).

A fim de estudar algumas propriedades farmacológicas a ayahuasca foi avaliada em testes de toxicidade aguda, atividade antiproliferativa *in vitro*, nocicepção induzida por ácido acético (dor periférica, central e inflamatória), teste da placa quente (dor neurogênica por ação direta) e em modelo de ansiedade.

Na avaliação de toxicidade aguda cinco grupos receberam pela via intraperitoneal doses diferentes da ayahuasca (100, 300, 500, 1000 e 2000 mg/kg) e três grupos nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg, pela via oral. Este modelo permite observar possíveis mudanças comportamentais dos animais tais como estado de consciência e disposição (aparência geral, resposta a frênico vocal), atividade autônoma (piloereção, salivação, diarreia), tono muscular (força para agarrar) e atividade do sistema nervoso central (locomoção). Durante a avaliação dos animais por um período de quatro horas, foram observadas mudanças significativas nas características gerais dos grupos tratados com as diversas doses da ayahuasca por via intraperitoneal e por via oral. Ayahuasca 100 mg/kg pela via intraperitoneal, não produziu efeitos detectáveis, porém nas doses de 300 e 500 mg/kg produziu tremores, abdução das patas e contratura da musculatura da base da cauda, caracterizando o efeito conhecido como cauda em *Straub*. Nas doses de 1000 e 2000 mg/kg, também pela via intraperitoneal, esses efeitos foram intensificados provocando morte dos animais. Por via oral foram observados tremores e cauda em *Straub* somente nas doses mais elevadas (300 e 500 mg/kg).

Tabela 2: Efeitos gerais produzidos em camundongos pela administração de ayuahuasca pelas via intraperitoneal e oral.

Doses	Via intraperitoneal	Via oral
100mg/kg	-----	-----
300mg/kg	Tr;AP;CS +	Tr,CS+
500mg/kg	Tr;AP;CS +	Tr,CS+
1000mg/kg	Tr;AP;CS ++	X
2000mg/kg	Morte	X

AP: abdução das patas, CS: Cauda straub, +: presença/ -: ausência, Tr: tremor.

O grupo tratado com ayahuasca na dose 2000 mg/kg por via intraperitoneal apresentou mudanças significativas nestes parâmetros, como por exemplo, intenso tremor e convulsões que tiveram início após 15 min e se repetiram nas duas horas subsequentes. Também foi observada cauda em *Straub*, piloereção (atividade autônoma), abdução das patas e morte em 4 hs (tabela 3).

Tabela 3: Evolução dos parâmetros na dose de 2000mg/kg do EB da ayahuasca.

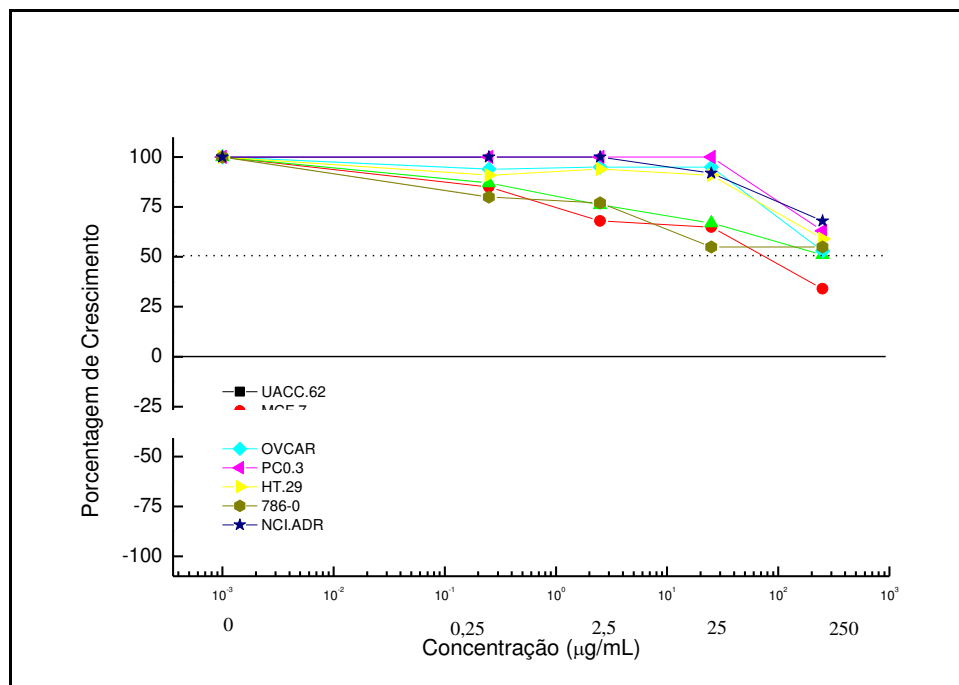
Tempo	Tremor	Convulsão	Tônus muscular	Outros*	Mortes
0-5 min	—	—	—	—	—
15 min	+	C	+	AP	—
30 min	++	C/T ++	++	CS	—
1 h	++	C/T +	++	AP/CS	20%
2 h	+	T	+	AP/CS	70%
4 h	—	—	—	AP/CS	100%

AP: abdução das patas, CS: Cauda straub, +: presença/ -: ausência, C:Convulsão Clônica, T: Convulsão Tônica.

A fim de complementar informações acerca da toxicidade da ayahuasca, foram avaliadas as possíveis ações citotóxicas através de modelo experimental *in vitro* de atividade antiproliferativa em linhagens tumorais humanas. Para análise da proliferação celular, utilizou-se o método não clonogênico da sulforrodamina B, que é um corante proteico que se liga aos resíduos dos aminoácidos básicos das proteínas de células que estavam viáveis no momento da fixação. Portanto, quanto maior a quantidade de SRB ligada ao compartimento, menor a atividade antiproliferativa da amostra em teste. Para a fixação das células viáveis foi empregado o ácido tricloroacético (TCA) que atua como fixador, precipitando proteínas. Desta forma, as células viáveis se mantêm fixas na placa, enquanto células não viáveis são eliminadas. Trata-se de um método independente do metabolismo celular e que permite a quantificação de proteínas de modo linear com o número de células da cultura, além de ser consideravelmente rápido, simples e apresentar sensibilidade comparável à de metodologias fluorescentes. Outra vantagem é a estabilidade da placa para leitura, pois as células são primeiramente fixadas, coradas e a medida da absorbância pode ser realizada muitos dias após o término do experimento (Rubinstein *et al.*, 1990; Skehan *et al.*, 1990; Monks *et al.*, 1991; Keepers *et al.*, 1991; Vichai e Kirtikara, 2006; Houghton *et al.*, 2007).

O gráfico gerado relaciona o crescimento celular em função da concentração da amostra avaliada (Figura 7). Os valores entre 100% e 0 representam proliferação celular, sendo a linha zero o marco para a inibição total de crescimento, ou seja, quando a quantidade de células ao final do experimento era a mesma do momento de adição das amostras (placa T0).

Figura 8: Atividade antiproliferativa *in vitro* da Ayahuasca em painel de linhagens tumorais após 48 horas de tratamento.



Linhagens: MCF-7 (mama), NCI/ADR-RES (ovário com fenótipo de resistência), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (cólon).

De acordo com este gráfico (figura 7) que relaciona a proliferação celular (%) em relação a concentrações da amostra (µg/mL), foi possível observar que a ayahuasca apresentou uma leve atividade citostática sobre a linhagem MCF-7, com efeito ainda menor nas demais linhagens. Estes resultados qualitativos foram expressos em uma concentração efetiva denominada GI₅₀, que representa a concentração necessária para inibir em 50% a proliferação celular (efeito citostático) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de GI₅₀ (em µg/mL) após o tratamento com ayahuasca frente às linhagens tumorais e não-tumorais.

Linhagens	GI(µg/ml)
MCF 7	57.17
NCI 460	>250
OVCAR	>250
HT 29	>250
C 786	>250
NCI ADR	>250
PC 0.3	>250

Linhagens: MCF-7 (mama), NCI/ADR-res (ovário com fenótipo de resistência), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), PC-3 (próstata), OVCAR-03 (ovário), HT-29 (cólon).

Este resultado sugere a presença de substâncias com ação antiproliferativa na ayahuasca e estão em concordância com os resultados obtidos por Schenberg e colaboradores (2013), onde a ayahuasca diminuiu o fluxo sanguíneo ao redor dos tumores, reduzindo a proliferação celular e ativando as vias de morte celular programada em células cancerígenas.

Esses efeitos da ayahuasca sobre as células cancerígenas podem estar relacionados com a harmina e o DMT, onde a harmina diminui a proliferação celular e ativa o processo de morte celular por apoptose. Já a DMT é transportada para o interior da célula através dos transportadores de serotonina (SERT) e das vesículas de monoaminas (VMAT2) (Schenberg, 2013).

A DMT por ter afinidade moderada pelo receptor intracelular sigma-1, que atua mediando o influxo de cálcio mitocondrial além de modular diversos canais iônicos presentes na membrana celular. Em concentrações elevadas de DMT, o influxo de cálcio e a despolarização da membrana mitocondrial são suficientes

para ativar a permeabilidade de transição do poro, induzindo a apoptose (Schenberg, 2013).

Os alcalóides β -carbolínicos foram isolados primeiramente a partir da espécie *Peganun harmala* (Zygophillaceae, Rue sírio) e nas duas últimas décadas, numerosos alcalóides desse grupo têm sido isolados e identificados como os principais compostos ativos em muitas espécies de plantas e invertebrados marinhos (Cao et al., 2007). Estes alcaloides apresentam um amplo espectro de atividade farmacológica incluindo antiespasmódica, antipirética, e alucinógenas através da inibição da monoamino oxidase (Farouk et al, 2008).

Embora a ayahuasca tenha apresentado efeito antiproliferativo muito fraco, trabalhos em colaboração com a professora Maria Helena Sarragiotto, do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá tem avaliado a atividade de uma série de derivados sintéticos das β -carbolinas. Vinte e seis novas beta-carbolinas foram sintetizadas pelo grupo da professora Sarragiotto, para avaliação da atividade anticâncer *in vitro*. Esse trabalho identificou dois compostos com elevada seletividade para a linhagem de ovário e um terceiro para pulmão, ovário e rim (Formagio et al., 2008). Outros vinte e um derivados foram sintetizados e os testes realizados com eles, em cultura de células tumorais, também revelaram compostos de elevada potência e seletividade (Savariz et al 2010). Após uma nova série de testes *in vitro*, de outros cinquenta novos derivados, o composto que apresentou o melhor perfil de atividade (β -carboline 3-N-benzylidene-carbohydrazies) foi selecionado e sintetizado em maior quantidade, para estudos de toxicidade aguda em camundongos e em modelo experimental de câncer, induzido pela injeção de células de Ehrlich na pata de camundongos. A dose de 30 mg/kg, que não produziu toxicidade nos teste agudos, reduziu o desenvolvimento tumoral, de forma semelhante ao 5-fluoracil (10 mg/kg), utilizado como controle positivo. Confirmou-se, assim, a atividade anticâncer observada *in vitro* (Barbosa et al., 2011). A continuidade desses estudos poderá determinar o mecanismo de ação dessas moléculas.

Esses resultados demonstram que dificilmente a ayahuasca poderá ser utilizada para o tratamento de alguma forma de câncer, mas as β -carbolinas, como as descritas anteriormente, podem dar sequência aos estudos para o desenvolvimento de um novo agente para o tratamento do câncer.

Entre os compostos identificados em produtos naturais, as β -carbolinas foram descritas com efeitos antidepressivos relacionados com a inibição da MAO e por sua ligação aos receptores benzodiazepínicos, imidazólicos, serotoninérgicos e opiáceos (Pires, 2010).

Em algumas situações, os antidepressivos têm sido usados para diminuir o processo doloroso por sua atividade no sistema nervoso central e periférico. As descobertas anteriores sobre as propriedades biológicas das β -carbolinas permitiram explorar as propriedades antinociceptivas da harmicina (que é uma β -carbolina, sintetizada a partir da harmina – composto presente em maior quantidade na ayahuasca) (Spindola et al, 2012).

Portanto, nas ações farmacológicas das β - carbolinas, e no efeito de cauda em *Straub*, observado nos testes gerais de atividade, que também está presente entre os efeitos dos opiáceos, a atividade antinociceptiva da ayahuasca foi avaliada em modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no modelo de algesia induzida por estímulo térmico (*Placa Quente*).

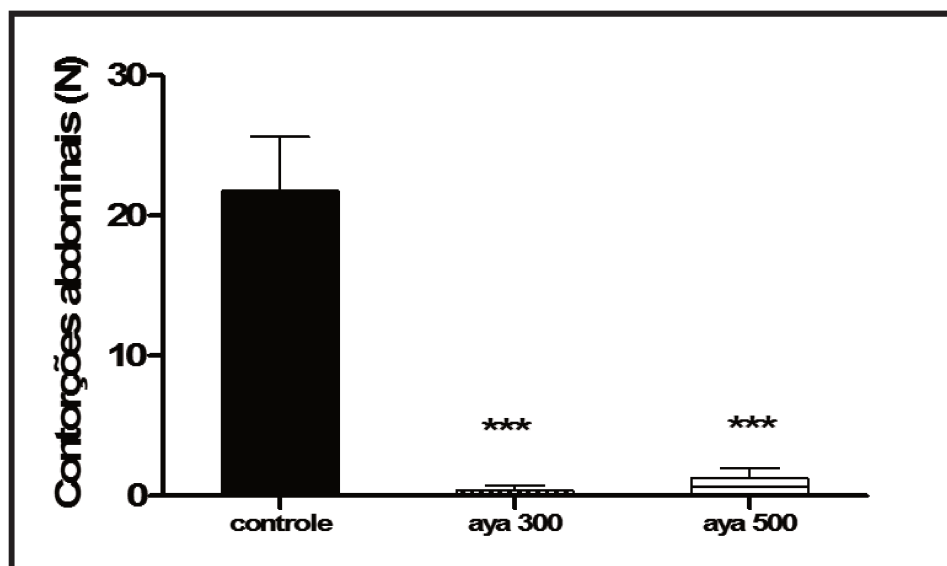
O teste de contorção abdominal avalia se o extrato possui atividade analgésica atuando diretamente na condução do estímulo doloroso ou por atividade anti-inflamatória. O ácido acético é um estímulo conveniente para testes de triagem porque a intensidade da resposta depende da interação de vários neurotransmissores e neuromoduladores relacionados com a nocicepção, tais como cininas, acetilcolina, substância P e prostaglandinas. (Cervero, et al., 1999; Shafiee, 2003). Portanto a reação dolorosa deste teste é sensível às drogas com atividade analgésica semelhante à aspirina, aos antagonistas de receptores cininérgicos e aos analgésicos opióides de ação central e periférica (Siegmund et al., 1957; Ochi et al., 2000).

Esse teste baseia-se na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (*Writhing*) como respostas reflexas à irritação produzida pela injeção intraperitoneal de ácidos fracos ou outros agentes inflamatórios (Siegmund et al., 1957). A contagem do número de contorções, durante um tempo pré-determinado, é tomada como índice da resposta nociceptiva (Koster et al., 1959).

Devido à baixa especificidade da resposta antinociceptiva, testes complementares são necessários para a interpretação dos resultados, pois vários compostos como os anti-histamínicos, parassimpatomiméticos parasimpatolíticos, estimulantes do sistema nervoso central, inibidores da MAO, antagonistas serotoninérgicos, neurolépticos e bloqueadores adrenérgicos, podem também inibir as contorções (Rates e Barros, 1994).

No grupo controle, previamente tratado com solução salina 0.9% (10 ml/kg,i.p), a injeção de ácido acético (0,8% i.p.) induziu $21,75 \pm 11$ contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O pré-tratamento com a ayahuasca nas doses de 300 mg/kg e 500 mg/kg (i.p.), reduziu o número de contorções abdominais em 90,32% ($0,37 \pm 1,0$) e 80,64% ($1,25 \pm 2,0$) respectivamente (figura 9).

Figura 9: Gráfico de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8% em salina) em camundongos previamente tratados (30 min) pela via intraperitoneal com salina 0.9% (10mL/kg) e ayahuasca nas doses de 300 e 500 mg/kg. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão da média. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Duncan, *** $p < 0,001$).

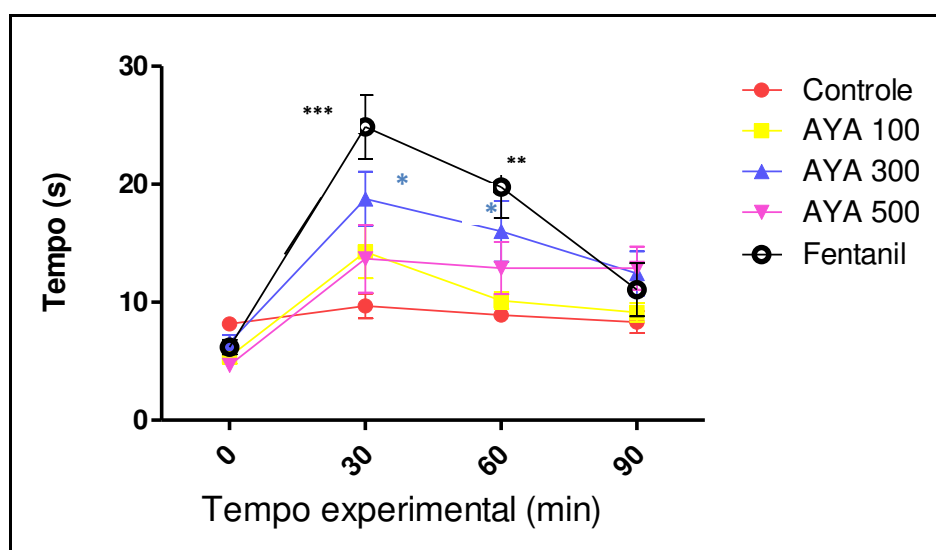


Demonstrada a ação antinociceptiva da ayahuasca no modelo de contorções abdominais, a possível atividade antinociceptiva por ação central foi investigada através do modelo de nocicepção induzida por estímulo térmico (Teste da Placa Quente). Este modelo avalia o tempo de reação do animal (quando o animal troca rapidamente o apoio, levanta ou lambe uma das patas) a um estímulo térmico produzido por uma superfície aquecida (56°C) (Woolfe et al., 1944). O tempo máximo de contato do animal com a placa quente deve ser mantido em 20 s (tempo de corte), para evitar lesões nas patas.

A Figura 9 apresenta os resultados obtidos relacionando a reação dos animais (segundos) durante o tempo experimental (minutos). Pode-se observar que após 30 e 60 min, a ayahuasca na dose de 300 mg/kg e o opióide fentanil (controle positivo) aumentaram o tempo de permanência na placa quente em comparação ao controle salina (controle negativo). Após 30 minutos a ayahuasca nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg, aumentou esse tempo de reação em 20,50% 39,06% e; 21,12%, respectivamente demonstrando atividade em dor de origem

neurogênica por ação direta no SNC. O fentanil (0.3 mg/kg) aumentou o tempo de reação dos animais em 73,90%.

Figura 10: Gráfico de reatividade ao estímulo térmico em camundongos previamente tratados (30 min) pela via intraperitoneal com salina 0.9% (10mL/kg), fentanil (0,3mg/kg) e ayahuasca 100, 300 e 500 mg/kg. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Duncan, *** $p < 0,001$, $p < 0,05$ e $p < 0,01$).



A combinação das duas espécies vegetais utilizadas para a produção da ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* + *Psychotria viridis*) pode elevar os níveis de noradrenalina, serotonina e de dopamina no cérebro pela inibição da MAO (Mckenna et al., 1998; Luna, 2005), e atuação em receptores da serotonina pela semelhança estrutural dos componentes ativos dessa bebida com esse neurotransmissor (Mckenna et al., 1998; Calaway et al., 1999; Grob et al., 2004). Corroborando com estas observações Grela e colaboradores demonstraram a afinidade destas substâncias por receptores serotoninérgicos, que podem alterar estados de ansiedade (Grela et al., 2003).

A DMT possui efeito agonista nos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} e 5-HT_{2C} semelhantes. Por outro lado as β -carbolicinas atuam como agonistas serotoninérgicos indiretos, pois a inibição da MAO, sobretudo MAO-A, que

desamina preferencialmente noradrenalina e serotonina, produz aumento dos níveis de serotonina no cérebro (Smith et al., 1998; Grela et al., 2003).

Trabalho em colaboração com o grupo do professor Ronaldo A. Pilli do Instituto de Química da Unicamp avaliou a harmicina, β -carbolina sintetizada por esse grupo de pesquisas. Essa substância apresentou efeito antinociceptivo, por redução da resposta dolorosa aos estímulos que desencadeiam, principalmente, dor neurogênica, mas sem atuação nos receptores opióides. Os estudos para determinar o mecanismo dessa atividade, revelaram que a harmicina atua, pelo menos em parte, através da inibição dos receptores vanilóides e de glutamato (Spindola et al., 2012).

Como já relatado, a ayahuasca após 1 h promove alterações no estado emocional, na percepção das formas, cores e sons, pânico e ansiedade, alterações auditivas, olfativas e visuais. Com esses relatos, foi realizada avaliação da interferência da ayahuasca na ansiedade através do modelo experimental do labirinto em cruz elevado (LCE), e da atividade locomotora e exploratória no modelo do campo-aberto (open field).

O labirinto em cruz elevado é amplamente utilizado como triagem para avaliar tanto drogas ansiolíticas como ansiogênicas sobre a atividade exploratória de roedores. Handley e Mithani (1984) observaram que os ratos têm preferência pelos braços fechados. Nesse trabalho, os ansiolíticos (diazepam) aumentaram o número de entradas dos animais nos braços abertos do labirinto, enquanto os ansiogênicos diminuíram o número de entradas nesses braços.

Este modelo tem como vantagens o baixo custo, a manutenção e a simplicidade para sua utilização. A principal desvantagem é a impossibilidade de reutilização dos animais em virtude da sua habituação a esse modelo experimental. Os parâmetros avaliados neste teste incluem o número de entradas nos braços abertos e fechados e o tempo de permanência em cada um deles (Carlini, 2011).

Os animais foram tratados com ayahuasca por via oral com ajuda de uma cânula gástrica (gavage) 20 minutos antes de serem colocados no centro do labirinto e observados por 5 minutos com auxílio de uma filmadora. Para cada animal foram determinados: o número de entradas (braços abertos + fechados), a percentagem de entrada nos braços abertos ($100 \times \text{entrada}/\text{total}$) e a percentagem do tempo permanência nos braços abertos [$100 \times \text{aberto}/(\text{aberto}+\text{fechado})$] (Pellow et al., 1985).

No parâmetro número de entrada nos braços fechados (NEBF), não houve diferença significativa entre os grupos que receberam os tratamentos em dose única e em doses repetidas (Figura 10), tratamento dose única: [$F(1, 19) = 1.800, p > 0.577$] e doses repetidas [$F(1, 12) = 1.003, p = 0.202$]. Já no parâmetro número de entrada nos braços abertos (NEBA), pode-se observar que os animais que receberam doses repetidas (figura 11) da ayahuasca tiveram um maior número de entradas, sugerindo efeito ansiolítico.

O resultado do labirinto em cruz elevado demonstrado na Figura 11 e 12, indicou uma diferença significativa entre os grupos na percentagem de entradas nos braços abertos no tratamento agudo: [$F(1,19) = 11.30, p = 0.04^*$]; crônico: [$F(1,12) = 9.463, p = 0.037^*$]. A administração oral de 1000 mg/kg da Ayahuasca produziu um aumento significativo tanto no número de entradas nos braços abertos, assim com a permanência no mesmo, sugerindo um efeito ansiolítico desta preparação.

É possível que o DMT, um agonista de receptores 5-HT_{1A} , $5\text{-HT}_{2A/2C}$, possa exercer efeito similar à serotonina nos receptores localizados na substância cinzenta periaquedutal dorsal atenuando os sintomas de ansiedade (Deakin e Graeff, 1991). Pela complexidade da farmacologia da ayahuasca que atua simultaneamente em diferentes sistemas de neurotransmissores, ligando-se em diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos, podem ter efeitos tanto ansiogênicos como ansiolíticos (Santos, 2007).

Figura 11: Gráfico relacionando o número de entradas nos braços fechados do Labirinto em Cruz (NEBF) de ratos que receberam ayahuasca em dose única ou em doses repetidas (15 dias intercalados) de 1000 mg/Kg (vo) e veículo 20 min antes da sessão experimental. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão. (One-way ANOVA seguido pós-teste de Duncan).

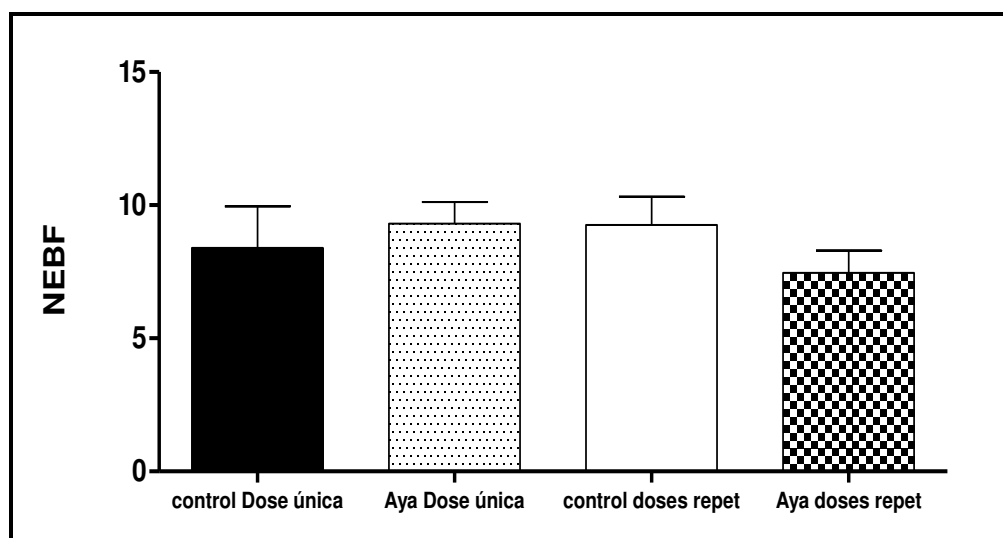


Figura 12: Gráfico relacionando o número de entradas nos braços abertos do Labirinto em Cruz (NEBA) de ratos que receberam ayahuasca em dose única ou em doses repetidas (15 dias intercalados) de 1000 mg/Kg (vo) e veículo 20 min antes da sessão experimental. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão. (One-way ANOVA seguido pós-teste de Duncan).

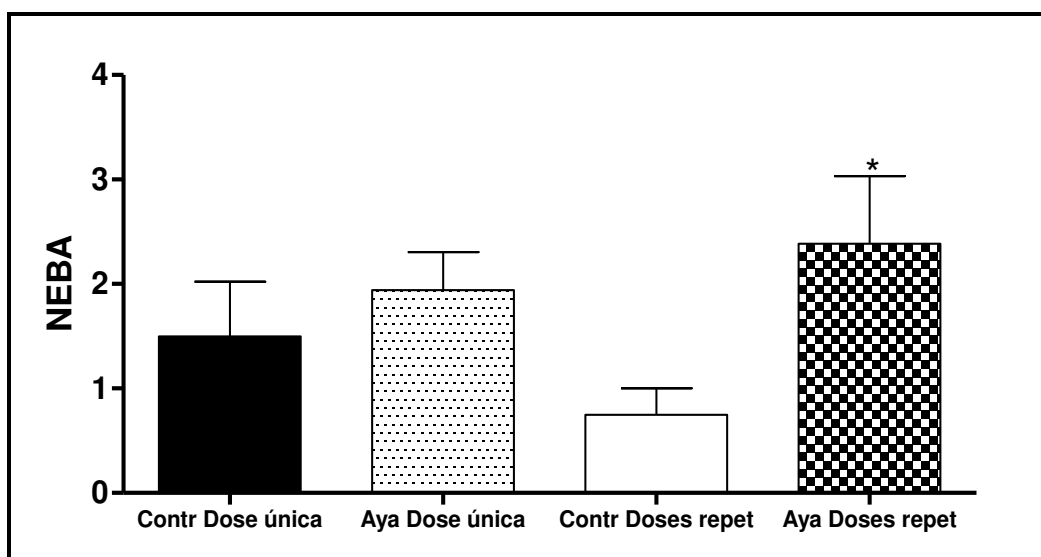
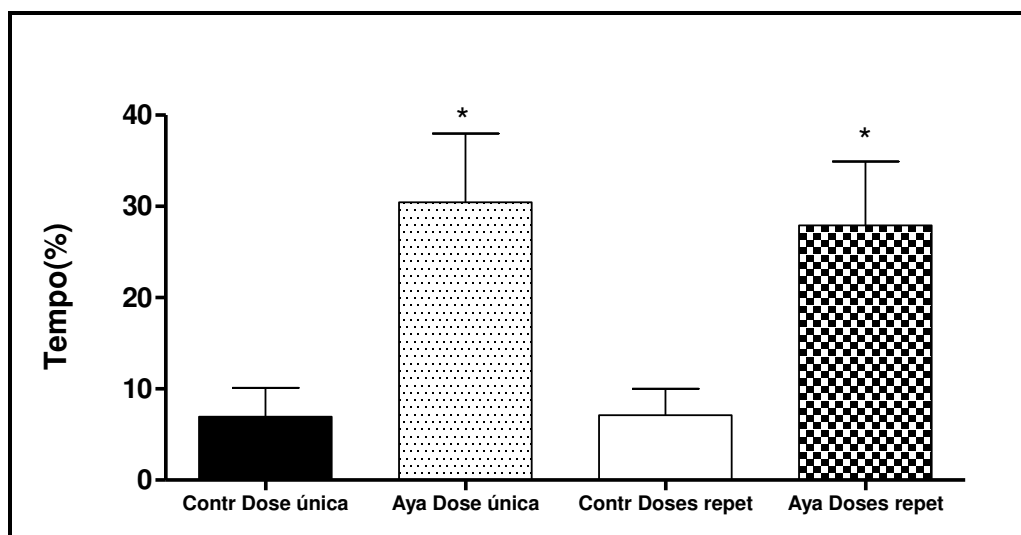


Figura 13: Gráfico relacionando o tempo de permanência no braço aberto do Labirinto em Cruz Elevado de ratos que receberam ayahuasca em dose única ou em doses repetidas (15 dias intercalados) de 1000 mg/Kg (vo) e veículo, 20 min antes da sessão experimental. Os resultados são expressos em média $\pm$ erro padrão (One-way ANOVA seguido do pós-teste de Duncan $*p<0,05$).



O teste do campo-aberto é um dos modelos mais antigos utilizados para o estudo da emocionalidade dos animais. Tem como princípio submeter o animal a um ambiente novo desconhecido do qual não é permitido escapar devido à presença de paredes laterais. O procedimento consiste em observar a ambulação, o comportamento de levantar-se (*rearing*), a autolimpeza e a defecação. Este teste é sensível aos efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos e agonistas dos receptores 5-HT_{1A}. Este modelo também se caracteriza pela simplicidade e fácil aplicação (Carlini, 2011).

Após a avaliação do comportamento no labirinto elevado, os animais foram colocados individualmente no campo-aberto por 5 minutos e mantidos em observação com auxílio de uma filmadora para determinar o número de cruzamentos, de levantamentos, de autolimpeza e de bolos fecais.

No parâmetro avaliando o número de cruzamentos (figura 13), pode-se observar que não houve diferença entre os diversos tratamentos e os controles negativos. Para confirmar as observações obtidas nos testes do labirinto em cruz

elevado, seria esperado um número maior de cruzamentos centrais sem modificações da locomoção total acompanhados de levantamentos (figura 14), que reforçariam a hipótese de atividade ansiolítica (Tabach, R. 2003).

No parâmetro de autolimpeza (Figura 15), é possível também observar que a ayahuasca não promoveu alteração quando comparado com seus grupos controle tanto em dose única quanto doses repetidas. No entanto, o grupo tratado com doses repetidas tanto a ayahuasca como a salina (controle negativo) promoveram aumento deste parâmetro quando comparado aos grupos tratados com dose única, sugerindo que o estresse da manipulação possa estar relacionado com esta alteração.

Quando os níveis de 5-HT aumentam, estimulam a inervação vagal do cérebro, que também controla a atividade do trato digestivo, provocando estímulos que aumentam a motilidade intestinal. No parâmetro bolos fecais (Figura 16), podemos observar um aumento na motilidade intestinal dos animais que receberam doses repetidas da ayahuasca (Sanders-Bush e Hazelwood, 2007).

Quando os receptores 5-HT_{1c} o 5-HT₂ são ativados, os níveis de IP₃ aumentam provocando a entrada de Ca⁺ intracelular que irá favorecer as secreções e a motilidade desses órgãos e tecidos, justificando alguns dos efeitos observado tais como vômito e diarreia. Este resultado pode ser observado em humanos que frequentam as seitas onde a náusea, vômito, diarreia são muitos frequentes depois da ingestão da ayahuasca.

Figura 14: Efeito da Ayahuasca sobre número de cruzamentos em ratos com deambulação livre em campo aberto tratados com dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas. Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão. (One-way ANOVA seguido de pós-teste de Duncan).

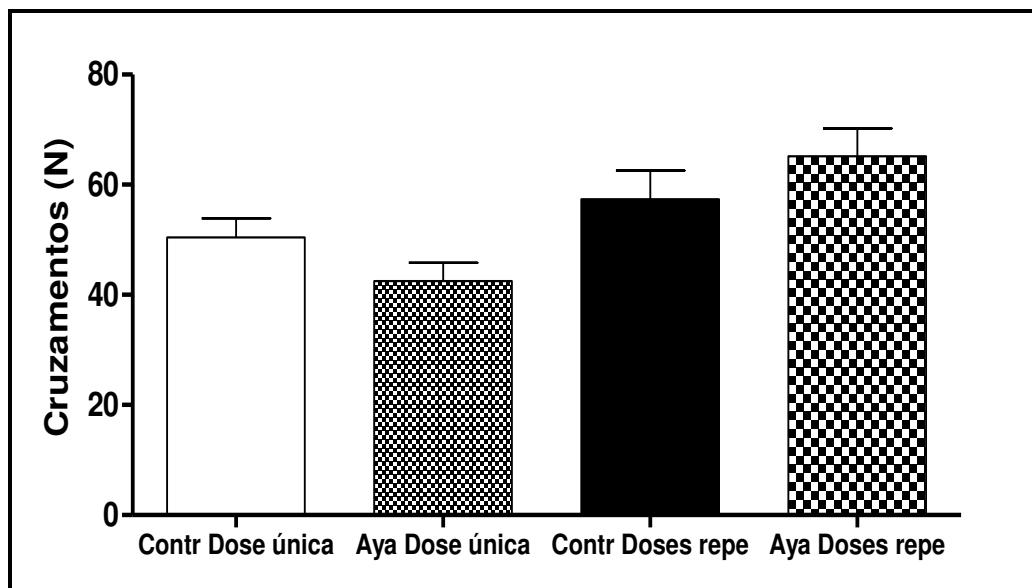


Figura 15: Efeito da Ayahuasca no número de levantamentos em ratos com deambulação livre em campo aberto após administração de dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão. (One-way ANOVA seguido pós-teste de Duncan).

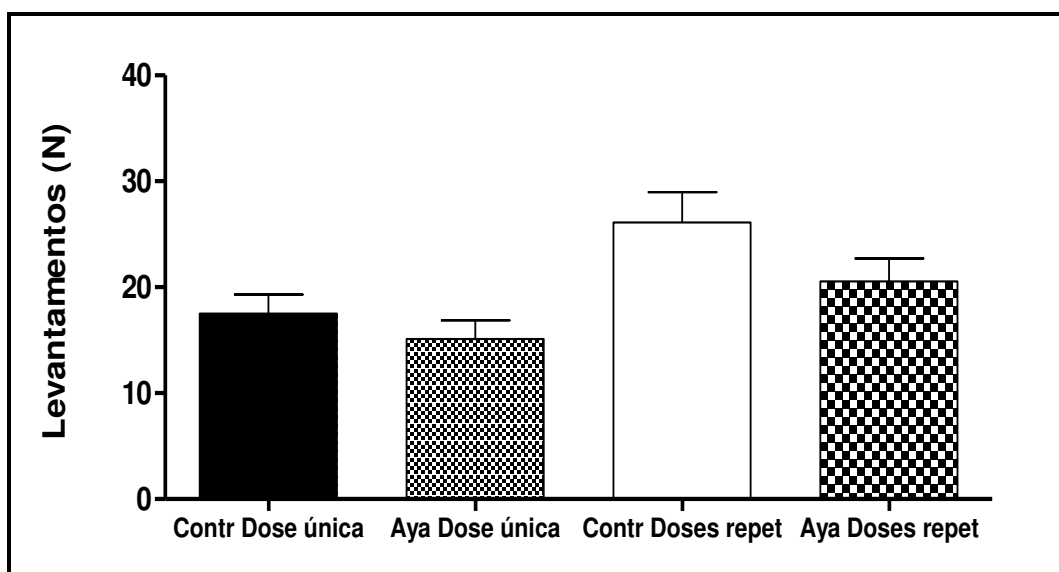


Figura 16: Efeito da Ayahuasca no número de autolimpeza, em ratos com deambulação livre em campo aberto, após administração de dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão. (One-way ANOVA seguido pós-teste de Duncan). Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão. (One-way ANOVA seguido de pós-teste pós-teste de Duncan, *** $p < 0,001$).

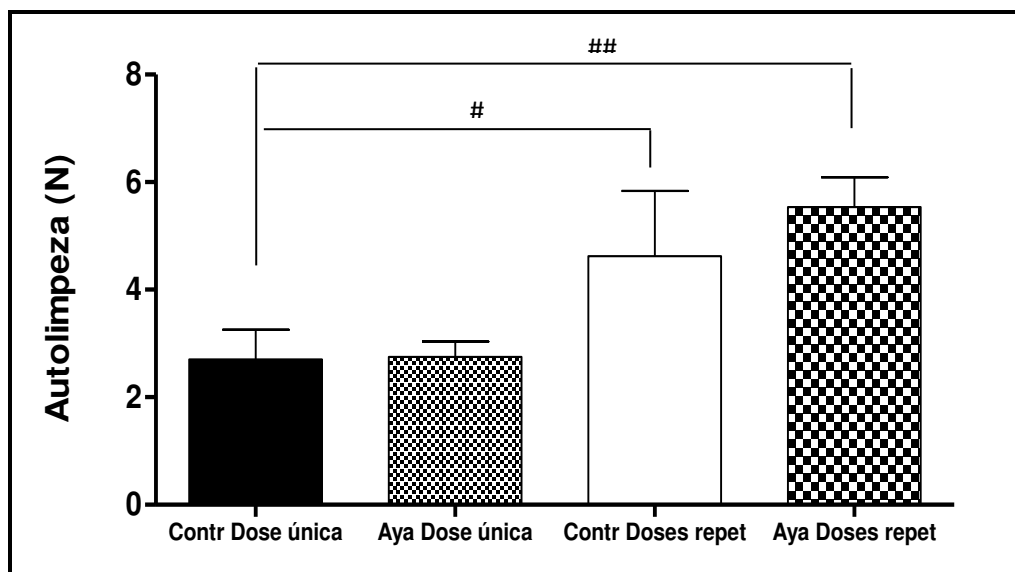
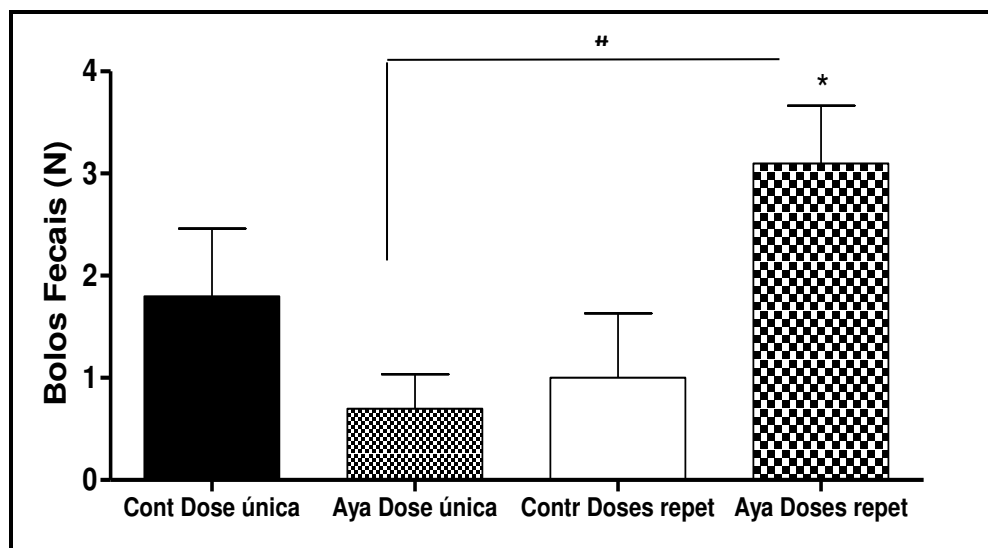


Figura 17: Efeito da Ayahuasca no número de bolos fecais em ratos com deambulação livre em campo aberto, após administração de dose única (1000 mg/kg,v.o) ou em dias alternados durante duas semanas. Os resultados estão expressos na forma de média $\pm$ erro padrão. (One-way ANOVA seguido pós-teste de Duncan).



Após o final dos experimentos em campo aberto o sangue desses animais foi coletado para observação de possíveis alterações nos parâmetros hematológicos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados e seus respectivos controles (administração única e em doses repetidas) com relação aos parâmetros hematológicos ($p>0,05$) (Tabela 5). Da mesma forma, quando analisados individualmente, não foram observadas alterações nesses parâmetros. (Anexo 1).

Tabela 5: Hemograma obtido após os tratamentos agudo e crônico em ratos adultos com ayahuasca 1000 mg/kg, em dias alternados por 15 dias.

Grupos	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Salina Agudo	5,76 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 0,2	11,22 $\pm$ 0,5	37,0 $\pm$ 1,4	61,7 $\pm$ 0,8	18,8 $\pm$ 1,0	30,4 $\pm$ 1,6	936 $\pm$ 137
-								
1000mg/kg Agudo	5,47 $\pm$ 1,5	5,4 $\pm$ 1,2	10,03 $\pm$ 2,2	33,3 $\pm$ 7,4	61,2 $\pm$ 1,5	18,4 $\pm$ 0,8	30 $\pm$ 0,8	857 $\pm$ 241
Salina Crônico	3,52 $\pm$ 7,8	7,12 $\pm$ 0,2	14,12 $\pm$ 0,6	42,5 $\pm$ 1,1	59,6 $\pm$ 0,9	19,8 $\pm$ 0,6	33,1 $\pm$ 1,2	333 $\pm$ 327
1000mg/kg Crônico	3,06 $\pm$ 5,0	5,94 $\pm$ 1,7	11,22 $\pm$ 3,1	35,9 $\pm$ 10,2	59,6 $\pm$ 0,9	18,9 $\pm$ 0,8	31,2 $\pm$ 1,5	316 $\pm$ 267

Este trabalho apresenta resultados que sugerem um possível efeito ansiolítico da ayahuasca confirmado pelo aumento do tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. No entanto, essa atividade não foi confirmada no teste de campo aberto e por isso, necessita de outros estudos que possam confirmar essa atividade. A ação ansiolítica evidentemente contrasta com os efeitos observados após administração inteperitoneal, com a presença de tremores intensos, e pela atividade pró-convulsivante observada nos estudos iniciais.

Esses resultados conflitantes realmente refletem a variabilidade de efeitos relatados por usuários e pelos estudos farmacológicos. Pode-se observar, que nos

testes avaliando a atividade antinociceptiva não existe uma correlação entre dose e efeito, com diminuição do efeito nas doses maiores e, no caso da placa quente, a maior dose não apresenta efeito antinociceptivo significativo. Sem dúvida alguma a miríade de efeitos produzidos pelos princípios ativos da ayahuasca é consequência do aumento de neurotransmissores produzidos pela inibição da MAO, pela atividade agonista inversa nos receptores de benzodiazepínicos e pelos efeitos mediados pela atividade nos receptores de serotonina. Dificilmente essa variabilidade de efeitos poderá sugerir algum efeito terapêutico dessa bebida, mas sim estabelecer as restrições necessárias para seu uso, especialmente em pacientes que sofrem de epilepsia, distúrbios persecutórios, síndrome do pânico, doenças neurológicas e em idosos e crianças.

6. CONCLUSÃO

- Os testes sobre a proliferação celular demonstraram a baixa citotoxicidade da ayahuasca.
- A atividade antinociceptiva observada nos testes iniciais, provavelmente é consequência da atividade inibidora sobre a monoamino oxi exercida pelas β -carbolinas.
- Os efeitos produzidos no teste de labirinto em cruz elevado são sugestivos de atividade ansiolítica, que devem ser confirmados em outros modelos experimentais de ansiedade,
- A variabilidade de ações observada nos diversos estudos realizados pela divisão de farmacologia e toxicologia do CPQBA coincidem com os relatos de efeitos produzidos em usuários. Além de dificultar um eventual uso terapêutico o consumo desse produto por pacientes com distúrbios psiquiátricos e neurológicos deve ser evitado. Essas restrições devem também ser estendidas aos idosos e crianças. No entanto, o aprofundamento dos estudos e a obtenção de derivados das β -carbolinas e da dimetiltryptamina podem possibilitar o desenvolvimento de novos medicamentos, com menor incidência de efeitos colaterais do que os produzidos pela ayahuasca.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida, R.N. **Psicofarmacologia**: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Blackburn, T.P. 5-HT receptors and anxiolytic drugs. In: Marsden, C. A.; Heal, D.J. eds, 1992. **Central serotonin receptors and psychotropic drugs**. Oxford: Blackwell. 175-197, 1992.

Barbosa, V. A., Formagio, A. S., Savariz, F. C., Foglio, M. A., Spindola, H. M., Carvalho, J. E., Meyer, E., Sarragiotto, M. H. Synthesis and antitumor activity of β -carboline 3-(substituted-carbohydrazide) derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, p.6400-6408 - , 2011.

Brierley, D.I; Davidson, C. Developments in harmine pharmacology – Implications for ayahuasca use and drug – dependence treatment. **Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry**. 39(2): 263-72, 2012.

Brito, G.S. Farmacologia Humana da Hoasca (chá preparado de plantas alucinógenas usado em contexto ritual no Brasil). In: Labate, B.C; Araujo, W.S, organizadores. **O uso ritual da ayahuasca**, Campinas. Mercado de letras, p.623-51, 2004.

Callaway, J.C., Airaskinen, M. M., Mckenna, D.J. et al. Platelet serotonin uptake sites increase in drinkers of ayahuasca. **Psychopharmacology**. v.116,p.385-387, 1994.

Callaway.J.C; Mckenna.D.J; Grob.C.S; Brito.G.S; Raymon.L.P; Poland.b.C.S; Brito.G.S; Raymon.L.P; Poland.E; Andrade.E.N; Andrade.E.O; Mash.D.C. Pharmacokinetics of Hoasca alkaloids in healthy humans. **Journal of ethnopharmacology**. 65, 243-256, 1999.

Calixto, J. B. Biodiversidade como fonte de novos medicamentos. **Ciência e Cultura**. 55(3): 37-39, 2003.

Cao, R., Peng, W., Wang, Z., Xu, A. β -carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Curr Med Chem**, 14 (4) (2007), pp. 479–500 (22)

Carlini, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 75: 501-512, 2003.

Cazenave, S.O.S. Banisteriopsis caapi: ação alucinógena e uso ritual. **Rev Psiquiatr Clin**. 7(1): 1-6, 2000.

Cemin, A. Ordem, xamanismo e dádiva: o poder do Santo Daime. Tese, São Paulo: Tese de doutorado em Antropologia Social, USP, 1998.

Ceulemans, D.L.S.: Hoppenbrouwers, M.L.J.A. Gelders, Y.G.: Reyntjens, A.J.M. The influence of ritanserin, a serotonin antagonist in anxiety disorders: A double-blind placebo-controlled study versus lorazepam. **Pharmacopsychiatry** . 18: 303-305, 1985.

Cervero, F.; Laird, J.M. Visceral pain. **Lancet**. 19: 353 (9170): 2145-8, 1999.

Costa, M.C.M., Figueiredo, M.C., Cazenave, S.O.S. Ayahuasca: Uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. **Rev Psiquiatr Clin**. 32(6): 310-8, 2005.

Cordell, G.A. Biodiversity and drug discovery: a symbiotic relationship. **Phytochemistry**. 55: 463-480, 2000.

Cragg, M.G.; Newman, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**. 100: 72-79, 2005.

Cunningham, N. Hallucinogenic plants of abuse. ***Emergency Medicine Australasia***. V.20 (2), p. 167-174, 2008.

D'amour, F.E and Smith, D.L. A method for determining loss of pain sensation. ***J. Pharmacol. Exp. Ther.*** v.72, p.74-79, 1941.

Elisabetsky, E., Ahmador, T.A., Albuquerque, R.R., Nunes, D.S. and Carvalho, A.C.T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Wild. ex-R. and S.) Muell. Arg. alkaloids. ***Journal of Ethnopharmacology*** .1995. 48.

Escobar, J.A.C; Roazzi, A. Panorama contemporâneo do uso terapêutico de substancias psicodélicas: Ayahuasca e Psilocibina. ***Neurobiologia***. 73(3),p. 159-172, 2010.

Farouk, A. Laroubi, R. Aboufatima, A. Benharref, A. Chait. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. ***J Ethnopharmacol***, 115 (2008), pp. 449–454.

Fellows, L. E. Pharmaceuticals from traditional medicinal plants and others: future prospects IN: Coombs, J.D.,ed. ***New drugs from natural sources***. London: IBC Technical Services, 1995.

File, S.E. Behavioural detection of anxiolytic action. In: Elliott, J.M.; heal, D.j.; Marsden, C.A., eds. *Experimental approaches to anxiety and depression*. London: ***John Wiley & Sons Ltd***. 25-44, 1992.

Formagio, A. S. N., Tonin, L.T.D., Foglio, M. A., Madjarof, C., Carvalho, J.E., Da Costa, W.F, Cardoso, F.P, Sarragiotto, M. H. Synthesis and antitumoral activity of novel 3-(2-substituted-1,3,4-oxadiazol-5-yl) and 3-(5-substituted-1,2,4-triazol-3-yl) B-carboline derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. , v.16, p.9660 - 9667, 2008.

Franco, M.C.P., Conceição, O.S. Breves revelações sobre a ayahuasca. O uso do chá entre os seringueiros do Alto Juruá. In: Mercado de Letras, Edições e Livraria Ltda. **O uso ritual da ayahuasca**. Campinas. p.201-225, 2004.

Gable, R.S. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. **Addiction**. 102(1): 24-34, 2007.

Graeff, F.G.; Guimarães, F.S.; Andrade, T.G.C.S.; Deakin, J.F.W. Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 54 (1), 129-141, 1996.

Grella, B., Teitler, M., Smith, C., Herrick-Davis, K., Glennona, R.A. Binding of beta-carbolines at 5-HT₂ serotonin receptors. **Bioorganic and Behavior**. 54, 129-141, 2003.

Grob, C.S., Mckenna, D.J., Callaway, J.C., Brito, G.S., Neves, E.S., Oberlaender, G., et al. Human Psychopharmacology of Hoasca, A plant Halluciogen Used in Ritual Context in Brazil. **J Nerv Ment Dis**. 184(2):86-94, 1996.

Goulart, S. Contrates e continuidades na tradição religiosa amazônica: os casos do Santo Daime, da Barquinha e UDV. In: Labate, B.C; Araujo, W.S, organizadores. **O uso ritual da ayahuasca**, Campinas. Mercado de letras. P.623-51, 2004.

Halky, J.J. 1974. The effects of dextroamphetamine, dimethyltryptamine, lysergic acid diethylamide and tetrahydrocannabinol upon pregnancy and the offspring. *Dissertation Abstracts International B 34* (12): 6137-8B.

Kohn, L. K.; Cazenave, S. O. S. Dias, P. C. ; Carvalho, J. E. . Efeitos da ayahuasca em modelos experimentais de epilepsia. In: X Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1995, Serra Negra, 1995.

Koster, R.; Anderson, M.; Beer, E.J. Acetic Acid for analgesic screening. ***Fed. Proceeding.*** 18: 412, 1959.

Labate, B.C., Araújo, W.S. O uso ritual da ayahuasca. ***Mercado de letras FAPESP***, São Paulo, 2002.

Labigalini, E.J. O Uso da ayahuasca em um contexto religioso de ex-dependentes de álcool. (Tese) São Paulo: Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina; 1998.

Luna, L.E. Narrativas da alteridade: a ayahuasca e o motive de transformação em animal. In: Labate, B.C., Goulart, S.L. ***O uso ritual das plantas de poder.*** Mercado de Letras, Campinas. P. 333-354, 2005.

Mckenna, D.J.; Towers, G.H.N; Abbott, F. Monoamine Oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and beta-carboline constituents of Ayahuasca. ***Journal of Ethnopharmacology.*** 10, 195-223, 1984

Mckenna, D.J., Callaway, J.C., Grob, C.S. The Scientific Investigation of Ayahuasca: A Review of Past and Current Research. ***The Heffer Review of Psychedelic Research.*** v.1, p.65-76, 1998.

Mckenna, D. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. ***Pharmacol Ther.*** 102 (1):111-29, 2004.

Melchior, C. and Collins, M.A. The route and significance of endogenous synthesis of alkaloids in animals. ***Crit Rev Toxicolog.*** 9:p. 313-356, 1982.

Miwa, H; Kubo, T; Suzuki, A; Kihia, T; Kondo, T. A species-specific difference in the effects of harmaline on the rodent olivocerebellar system. ***Brain. Rev.*** (1068): 94-101, 2006.

Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolff A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. ***Journal of the National Cancer Institute.*** 83: 757-766, 1991.

Nash. J.R., Nutt.D.J. Psychopharmacoterapy of Anxiety. ***Handbook of Experimental Pharmacology.*** 2005. Vol. 169, 401-469.

Oliveira, C.D.; Moreira, C.Q.; de Sa, L.R.; Spinosa, H. de S. & Yonamine, M. 2010. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in Wistar rats. Birth Defects Research. Part B, ***Developmental and Reproductive Toxicology*** 89 (3): 207-12.

Ott.J. Pharmahuasca: Human pharmacology of oral DMT plus harmine. ***J Psychoact drugs.*** 31: 171-177, 1999.

Pelaez, M.C. Santo Daime, transcendência e Cura. Interpretação sobre as possibilidades terapêuticas da bebida atual, In: Labate, B.C; Araujo, W.S, organizadores. ***O uso ritual da ayahuasca***, Campinas. Mercado de letras. p.623-51, 2004.

Pellow, S.; Chopin, P.; File, S.E.; Briley, M. Validation of open: Closed arm entries in the elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neuroscience. Methods**. 14: 149-167, 1985.

Pires, A.P; Oliveira, C.D; Yonamine,M. Ayahuasca: Uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. **Rev.Cienc.Farm.basica apli**. 31(1): 15-23, 2010.

Pomilio AB, Vitale AA, Ciprian-Ollivier J, Cetkovich-Bakmas M, Gómez R, Vázquez G. Ayahuasca: an experimental psychosis that mirrors the transmethylation hypothesis of schizophrenia. **J Ethnopharmacol**. 1999;65(1):29-51.

Rates, S.M.K.; Barros, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos **Rev. Bras. Farm**. 75(2):31-34,1994.

Riba.J; Fornells.R.A; Urbano.G; Morte.A; Antonijoan.R; Monteiro.M; Callaway.C.J; Barbanoj.J.M. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage Ayahuasca in healthy volunteers. **Psychopharmacology**. 154, 85-95, 2001.

Riba.J;Valle.M; Urbano.G; Yritia.M; Morte.A; Barbanoj.J.M. Human Pharmacology of Ayahuasca: Subjective and Cardiovascular Effects, Monoamine Metabolite Excretion, and Pharmacokinetics. **The journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 306, 73-83, 2003.

Riba,J; McIlhenny, E.H; Valle, M; Bouso, J.C; Barker, S.A. Metabolism and disposition of N-N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after oral administration of ayahuasca. **Drug Test Anal**. (7-8): 610-6, 2012.

Sanders-Bush, E e Hazelwood L. 5 – Hidroxitriptamina (serotonina). In: Goodman, L.S; Gilman, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed.Rio de Janeiro: Ed McGraw-Hill, 2007.1848p.

Samoylenko, V. Rahman, M.M; Tekwani, B.L; Tripathi, L.M; Wang, Y.H; Khan, S.L. *Banisteriopsis caapi*, a unique combination of Mao inhibitory and antioxidative constituents for the activities relevant to neurodegenerative disorders and parkinson's disease. **J. Ethnopharmacology**. 127(2), p. 357-67, 2010.

Santos. R.G; Fernandes.L.J; Strassman.R.J; Motta.V; Cruz. A.P.M. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. **Journal of ethnopharmacology**. 112, 507-513, 2007.

Savariz, F.C., Formagio, A.S.N., Barbosa, V. A., Foglio, M.A., Carvalho, J.E., Duarte, M.C.T., Dias Filho, B. P., Sarragiotto, M. H. Synthesis, antitumor and antimicrobial activity of novel 1-substituted phenyl-3-[3-alkylamino(methyl)-2-thioxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl] beta-carboline derivatives. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases** (Online). , v.21, p.288 - 298, 2010.

Schenberg, E.E. Ayahuasca and Cancer treatment. **Sage opne Medicine**. p-1-12, 2013.

Schwarz, M.J; Houghton, P.J; Rose, S; Jenner, P; Lees, A.D. Activities of extract and constituents of *Banisteriopsis caapi* relevant to parkinsonism. **Pharmacol. Biochem. Behav.** (75): p. 627-633, 2003.

Shoemaker RH. The NCI60 human tumor cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**.6: 813-823, 2006.

Smith, R.L., Canton,H., Barret, R.J., Sanders-Bush, E. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at 5-HT 2_A and 5-HT 2_c serotonin receptors. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 61: 323-330, 1998.

Shafiee, A., Bagheri, M., Shekarchi, M., Abdollahi, M. The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3, 5-disubstituted-2 pyrazolines in mouse writhing test. **J. Pharm. Sci.** 6 (3): 360 – 2, 2003.

Shanon, B. The antipodes of the mind: Charling the phenomenology of the ayahuasca experience. Nova York: **Oxford University Press.** 2002

Skehan, P; Storeng, R; Scudiero, D. Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. **J.Nat.Cancer Inst.**, 82:1107, 1990.

Spindola, H.M; Vendramini-Costa, D.B; Rodrigues, M.T; Foglio, M.A;Pilli, R.A;Carvalho, J.E. The antinociceptive activity of harmicine on chemical-induced neurogenic and inflammatory pain models in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior.** v. 102, p. 133-138, 2012.

Starcevic, V. Anxiety states: a review of conceptual and treatment issues. **Current Opinion in Psychiatry.** 19, 79-83, 2006.

Sternbach.H. The Serotonin Syndrome. **Journal of Psychiatry.** 148, 705-713, 1991.

Strassman, R.J., Qualls, C.R.Dose-response study of N, N- dimethyltryptamine in humans. I. Neuroendocrine, autonomic, and cardiovascular effects. **Arch Gen Psychiatry.** 51(2): 85-97, 1994.

Suggitt, M and Bibby, M.C. 50 years of preclinical anticancer drug screening Empirical to target-driven approaches. **Clinical Cancer Research.** 11:971-981, 2005.

Tabach, R. Modelos Animais para o estudo de Drogas Ansiolíticas. In: Protocolos em Psicofarmacologia comportamental. Carlini, E. A. Unifesp, p-159-180, 2011.

Yritia.M; Riba.J; Ortuño.J;Ramirez.A; Castilho.A; Alfaro.Y; Torre.R; Barbanoj.M.J. Determination of *N,N- dimethyltryptamine* and β -carbolnie alkaloids in human plasma following oral administration of *Ayahuasca*. ***Journal of Chromatography B***. 779, 271-281, 2002.

Wikinski, S. Depression and anxiety: from clinic to pharmacological treatment. ***Vertex***. 15, 208-212, 2004.

Woolfe, G.; Macdonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride. ***J. Pharmacol. Exp. Ther.*** 80: 300-307, 1944.

7. Anexos

Anexo 1: Tratamentos Dose única e Doses repetidas (1000 mg/kg)

Dados Hematológicos dos ratos submetidos ao LCE e ao Campo aberto.

	Animal	WBC	RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT
		($\times 10^3/\mu\text{L}$)	($\times 10^6/\mu\text{L}$)	(g/dL)	(%)	(fL)	(pg)	(g/dL)	($\times 10^3/\mu\text{L}$)
SALINA AGUDO	1	5.5	6.25	10.7	38.4	61.3	17.2	28	552
	2	5.1	5.88	11.6	36.9	62.8	19.7	31.4	597
	3	5.9	6.01	11.7	36.3	60.5	19.6	32.4	527
	4	6.9	5.65	10.7	35	61.9	19	30.6	549
	5	5.4	6.17	11.4	38.4	62.3	18.6	29.8	770
DOSE ÚNICA	1	6.2	6.44	12.1	40.7	63.2	18.8	29.7	416
	2	4.5	5.86	11.4	36.2	61.8	19.4	31.4	428
	3	5.7	5.87	10.4	35	59.7	17.7	29.6	427
	4	6.9	5.96	11.2	36.6	61.4	18.8	30.5	468
	5	8.4	6.14	11.6	38.1	62	18.8	30.4	436
	6	4.4	6.20	10.8	38	61.3	17.5	28.5	380
	7	3.8	3.11	5.5	38.6	59.9	17.7	29.5	690
	8	3.1	3.40	6.3	20.8	61.3	18.4	30	678
	9	6.1	6.11	10.6	35.7	58.4	17.3	29.6	786
	10	5.6	5.29	10.4	33.3	62.9	19.7	31.3	753
SALINA CRÔNICO	1	5.4	6.96	14	41.8	60	20	33.3	975
	2	5.2	6.91	13	41.5	60	18.8	31.3	944
	3	6.3	7.48	14.8	43.4	58	19.8	34.1	1105
	4	7	7.01	14.4	41.8	59.6	20.6	34.5	723
	5	5.5	7.27	14.4	44.1	60.6	19.8	32.7	935
DOSES REPETIDAS	1	5.9	6.41	12.8	38.3	60	20	33.4	1001
	2	6.1	7.29	13.6	44	60	18.7	31.1	955
	3	6.4	7.32	12.5	38.2	58	19.2	30.9	685
	4	7.1	6.44	12.2	39.1	59.6	18.9	31.2	1085
	5	4.3	6.83	12.7	40.2	60.6	18.6	31.7	1029
	6	4.9	5.60	10.9	34.7	60	19.5	31.5	999
	7	5.4	5.76	11.2	34.7	60	19.4	32.2	418
	8	7.6	6.53	11.4	39.4	58	17.4	28.8	484
	9	7	6.20	12.4	37.8	59.6	20.1	32.9	1029
	10	5	7.02	12.5	43.3	60.6	17.8	28.9	852

Anexo 2: Certificado emitido pelo Comitê de Ética em experimentação animal



CEUA/Unicamp

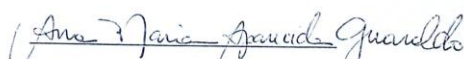
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

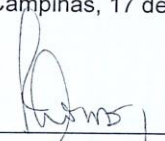
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Efeito ansiolítico da Ayahuasca" (protocolo nº 3105-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho / Mariana Cecchetto Figueiredo, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 17 de julho de 2013.

Campinas, 17 de julho de 2013.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>