

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO
UNIDADE DE BIOTECNOLOGIA**

Luciano José Ramos

**Avaliação do Potencial Ansiolítico do Óleo Essencial de *Achyrocline
satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae**

**RIBEIRÃO PRETO-SP
2014**

LUCIANO JOSÉ RAMOS

**Avaliação do Potencial Ansiolítico do Óleo Essencial de *Achyrocline
satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae**

Dissertação apresentada à Universidade de
Ribeirão Preto-UNAERP, como requisito para a
conclusão do Curso de Mestrado em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rene Oliveira Beleboni

Unidade de Biotecnologia - UNAERP

RIBEIRAO PRETO-SP

2014

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

R175a Ramos, Luciano José, 1974-
Avaliação do Potencial Ansiolítico do Óleo Essencial de
Achyrocline satureioides (Lam.) DC. – Asteraceae / Luciano
José Ramos. - - Ribeirão Preto, 2014.
60 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Rene Oliveira Beleboni.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2014.

1. Atividade Ansiolítica. 2. Etnofarmacologia. 3. Óleo Essencial.
I. Título.

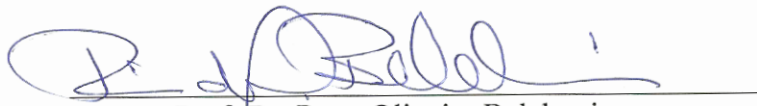
CDD 660

LUCIANO JOSÉ RAMOS

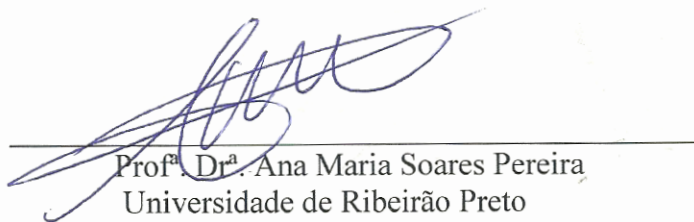
**Avaliação do Potencial Ansiolítico do Óleo Essencial de *Achyrocline satureioides*
(Lam.) DC. - Asteraceae**

Dissertação apresentada à Universidade de
Ribeirão Preto-UNAERP, como requisito para a
conclusão do Curso de Mestrado em
Biotecnologia.

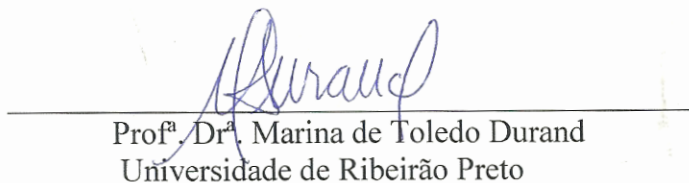
Aprovação: 09/12/2014



Prof. Dr. Rene Oliveira Beleboni
Universidade de Ribeirão Preto
Orientador



Profª. Drª. Ana Maria Soares Pereira
Universidade de Ribeirão Preto



Profª. Drª. Marina de Toledo Durand
Universidade de Ribeirão Preto

Dedico a meus pais Armindo da Costa Ramos e Maria Lucia Zorzetto Ramos,
por ter me concebido a vida, pela educação e amor desprendidos em todos os momentos
da minha existência.

A minha esposa Missione Táparo Ramos pelo apoio a minha vida acadêmica e
pelo carinho a mim mostrado ao longo desses anos de partilha.

A toda minha família pelo convívio fraterno.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concebido a Luz Divina.

A meus pais, por cada gota de suor derramado em longos dias de trabalho para criarem e educarem seus cinco filhos e, especialmente pela dedicação para minha educação e na formação dos pilares do meu ser.

A minha esposa pelo amor, companheirismo e compreensão durante minhas ausências estudantis.

A meu orientador Prof. Dr. Renê Beleboni, por ter acreditado no meu projeto, pela amizade e socialização de conhecimentos.

A Prof.^a Dr.^a Janete Franci por ter me aberto às portas de seu laboratório e ter me trilhado nos caminhos da Ciência.

A Prof.^a Dr.^a Silvia Helena Taleb Contini pela colaboração nos trabalhos de CG-EM.

A minha amiga de laboratório Érica Gelfuso Rossete, pela ajuda desprendida no decorrer de minhas atividades.

A meu amigo de mestrado Hugo Garcia, pela colaboração nos trabalhos de hidrodestilação do óleo essencial.

A todos os professores e educadores, que passaram pela minha vida e em especial aos professores da UNAERP, pelo aporte a minha formação.

A Secretaria de Educação de São Paulo, por ter fomentado meu projeto de pesquisa, no formato de bolsa.

A todos profissionais da UNAERP e a todos aqueles que direta ou indiretamente cooperaram para a realização deste trabalho acadêmico.

Muito obrigado!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. ANSIEDADE: ASPECTOS GERAIS E SUAS IMPLICAÇÕES	9
1.2. MECANISMOS NEURAIS/NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E TRATAMENTO	13
1.3. <i>Achyrocline satureioides</i> (Lam.) DC. - Asteraceae.....	21
2. OBJETIVO GERAL.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1. COLETA DA PLANTA, EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL	25
3.2. ANIMAIS	26
3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	26
3.4. GRUPOS DE ANIMAIS, DOSES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO PARA OS ENSAIOS DE LCE, CAIXA CLARO/ESCURO E CAMPO ABERTO.....	27
3.5. BIOENSAIO: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)	27
3.6. BIOENSAIO: TESTE DO CAMPO ABERTO (<i>OPEN FIELD</i>).....	27
3.7. BIOENSAIO: TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO.....	28
3.8. BIOENSAIO: TESTE DO ROTAROD	28
3.9. ANÁLISE HISTOLÓGICA	29
3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

A ansiedade patológica é um distúrbio neurológico que afeta milhares de pessoas em todo o mundo, sendo caracterizada por sintomas bem definidos e que trazem vários transtornos às pessoas que dela padecem. Com efeito, é importante que pacientes recebam tratamento que seja adequado e de fato efetivo. A planta *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – Asteraceae tem sido tradicionalmente utilizada como ansiolítica, sedativa e calmante natural, sendo abundante em todo território brasileiro. Nos estados do sul do país, e especialmente no Rio Grande do Sul, suas inflorescências são colhidas para compor o estofado de travesseiros e estofados, na tentativa de diminuir a ansiedade e tranquilizar o sono, fortalecendo assim sua importância na medicina popular. Entretanto e apesar de seu uso disseminado para os propósitos supracitados, nenhuma comprovação científica destes efeitos, incluindo, pois, o efeito ansiolítico, tem sido rigidamente relatada. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de investigar o uso popular do óleo essencial de inflorescências de *A. satureioides*, com ênfase especial em seu potencial efeito ansiolítico. Para dados, foram utilizados os ensaios do Labirinto em Cruz Elevado (LCE), do Campo Aberto (*Open Field*), o teste Claro-Escuro e o Rotarod, todos classicamente envolvidos na validação farmacológica de ativos potencialmente ansiolíticos. Nossos resultados, envolvendo a administração do óleo essencial de *A. satureioides* via intracerebroventricular (i.c.v.) em ratos, comprovaram a ausência de efeito ansiolítico significativo para as diferentes doses do óleo testadas, ao mesmo tempo em que não foram observados nas condições experimentais de estudo: perda da atividade motora, efeito catatônico, sedação ou prejuízo no desempenho geral dos animais sob análise neuroetológica. O óleo em estudo foi obtido por hidrodestilação e submetido à Cromatografia Gasosa acoplada de Espectrometria de Massas (CG-EM) para caracterização/marcação fitoquímica, que mostrou ser o mesmo bastante rico em alfa-pineno (45,49%), o que está de acordo com o relatado na literatura científica. Finalmente, o trabalho apresenta marcado interesse etnofarmacológico e epidemiológico, pois evidencia dados contrários ao uso popular do óleo da planta, sobretudo na forma de aromaterapia, ao menos nas nossas condições experimentais. Isto é imperativo na oferta de alternativas terapêuticas que sejam de fato validadas e efetivas no tratamento sucedâneo ou complementar da ansiedade, em que pese a necessidade de maiores estudos.

Palavras-Chaves: Labirinto em Cruz Elevado (LCE): Claro-Escuro: Campo Aberto (*Open Field*): Atividade Ansiolítica: Etnofarmacologia: Óleo Essencial.

ABSTRACT

Pathological anxiety is a neurological syndrome that complies millions of individuals worldwide. Therefore, effective and well validated treatments must be disposed for people suffering of the harmful symptoms evolving anxiety. The plant *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. – Asteraceae has been traditionally used in Brazilian folk medicine due to its anxiolytic, sedative and tranquilizer properties. In fact and particularly in South of Brazil, it is very common the use of flowering plant in wadding pillow in order to promise a better and more comfortable sleeping, which is also explored by industries that produces pillows to sale. However and besides disseminated folk uses, no scientific validation of those properties, including anxiolytic ones, has been strictly reported. Thus, the main aim of this work was to investigate the popular use of essential oil of flowering *A. satureioides* with special emphasis on its potential anxiolytic effects. It was used the Elevated Plus Maze test, Open Filed test, Ligth/Dark Box and Rotarod tests, traditionally used on experimental validation of new potential anxiolytics. According our results, evolving the i.c.v injection of different doses of *A. satureioides* essential oil, no significant anxiolytic effect was observed as well as no locomotor impairments, catatonia or sedation were caused to animals under neuroethological analysis according our experimental conditions. Also in this work, a complete phytochemical characterization of essential oil of *A. satureioides* was provided by use of Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) that showed to be the oil rich in alpha-pinene (45.49%) which is in accordance to previous reports. Finally, this work has a marked ethonopharmacological and epidemiological interest, since it showed for the first time data in an opposed sense of folk medicinal usage of plant, particularly when considered the aromatherapy approach and the our experimental conditions. It is imperative in the offer of substitutive or complementary therapeutic alternatives for anxiety control.

KEYWORDS: Elevated Plus Maze test; Open Filed test; Ligth/Dark Box test; Ethopharmacology; Anxiolytics and Essential oils.

1. INTRODUÇÃO

1.1 ANSIEDADE: ASPECTOS GERAIS E SUAS IMPLICAÇÕES

Todos os seres humanos apresentam ao longo da vida variações afetivas normais e ligadas a sentimentos de desânimo, frustração, euforia, interesse ou prazer, em resposta a estímulos psico-ambientais. Contudo e em alguns casos, essa resposta pode evoluir para uma patologia, ou seja, para um distúrbio psiquiátrico que se caracteriza por um transtorno afetivo ou do humor, o que neste caso repercute em importantes implicações de diferentes ordens (GUIMARÃES, 1996; STOPPE JR. & LOUZÃ NETO, 1997).

Segundo o consenso mais comum, a ansiedade é tida como sinônimo de angústia e de tormento, sendo um estado emocional acompanhado de alterações somáticas (cardíacas e respiratórias, principalmente) em que o indivíduo prevê ou antecipa situações desagradáveis de natureza real ou imaginária (FERREIRA, 2001). Já Funchs e Wannmacher (2012) descrevem a ansiedade como sendo um sentimento que muitas vezes nos direciona ou condiciona positivamente para uma ação em resposta aos estímulos do estresse de diferentes tipos, quando ainda em proporção de normalidade. Entretanto, a demasia da resposta, sobretudo em termos de sua longevidade e intensidade, pode levar à incapacidade ou prejuízo de ação, sendo tal processo desencadeado por uma situação em geral imaginária ou traumática e intermediado por neurotransmissores específicos. Por fim, o nível alto de ansiedade atinge o rendimento das tarefas individuais, sobretudo ao atrapalhar o ânimo e a concentração, de modo a prejudicar rotineiramente o indivíduo. A avaliação dos níveis de ansiedade é conhecida como curva de *Yerkes-Dodson* e ajuda a analisar os aspectos adaptativos ou mal adaptativos da ansiedade e, é nesse último sentido que certos estados da ansiedade são considerados transtornos e necessitam de intervenção psiquiátrica e/ou farmacológica (GRAEFF e GUMARÃES, 2000).

Assim, a ansiedade é considerada como distúrbio quando ocorre em exagero e sem motivos aparentes em resposta a um determinado tipo de estresse, onde neste caso perde sua função adaptativa e positiva, como acima discutido, desencadeando sofrimento e exigindo intervenção terapêutica. O transtorno de ansiedade pode caracterizar-se pela sensação de morte iminente, medo, sudorese, taquicardia, xerostomia, mal estar estomacal, falta de ar, formigamentos e coceiras pelo corpo, vontade de evacuar, insônia, incapacidade de se concentrar, tomar decisões ou realizar

um determinado trabalho, o que em geral limita a qualidade de vida do indivíduo, sobretudo, pela cronicidade de tais sintomas (DAVISON, 2008; STHAL, 2012). Ademais, essas alterações de fundo psicológico ou somático e, mais atualmente também de fundo neurobiológico (LAMBERT e NABER, 2008), podem, quando em excesso, levar a outras patologias, como: alterações respiratórias relacionadas à conexão da amígdala com o núcleo parabraquial no tronco cerebral, podendo provocar dispneia, exacerbação da asma ou uma falsa sensação de sufocamento/asfixia (BOURAS e HOLT, 2007).

Existem várias áreas cerebrais e circuitos neurais envolvidos nos processos de desenvolvimento, manutenção e no tratamento da ansiedade, tais como sistema límbico (septo, hipocampo, giro do cíngulo, porções do hipotálamo, amígdala e outras porções do lobo temporal) e córtex pré-frontal medial, bem como suas conexões via sistemas monoaminérgicos (serotonina, norepinefrina e dopamina) e outras áreas do tronco cerebral (como a substância cinzenta periaquedutal dorsal) (FUNCHS e WANNMACHER, 2012). Sabe-se que conexão entre a amígdala e o *locus ceruleus* pode deflagrar respostas do sistema autônomo que liberam noradrenalina com consequente aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial (PACAK e PALKOVITS, 2001). No caso de algumas síndromes crônicas, é possível o desdobramento em longo prazo para arteriosclerose, isquemia cardíaca, hipertensão de difícil controle, infarto do miocárdio e até morte súbita, atuando a ansiedade como entidade precipitante ou facilitadora destas ocorrências (STAHAL, 2002). Todos estes eventos potencialmente associados complicam ainda mais o prognóstico da síndrome de ansiedade, revelando, por certo, sua importância clínico-prática.

Além dos complicadores físicos, os transtornos de ansiedade costumam ter associado o chamado “sintoma” psicológico, “a preocupação”, podendo esta se manifestar no formato de sofrimento ansioso, expectativas apreensivas, pensamentos catastróficos e obsessão. Tais manifestações podem levar a sérios problemas de ordem social, como aqueles agregados aos comportamentos agressivos e/ou aversivos, e aqueles que levam a casos de reclusão/isolamento e invalidez (KAZUO NAKAMURA E MITSUE KURASAWA, 2001).

Embora não seja fácil classificar a ansiedade patológica e existam controvérsias em relação às suas exatas classificações nosológicas, a Associação Americana de Psiquiatria elabora, desde 1952, o *Manual Estatístico e Diagnóstico dos Transtornos Mentais*, que é amplamente utilizado e reconhecido por profissionais da área da saúde.

Atualmente esse manual encontra-se na sua quinta versão (*DSM-5*), tendo sido lançado ao público especializado em maio de 2013. Segundo este manual os transtornos de ansiedade principais estão classificados em:

Transtorno de Ansiedade de Separação: Ocorre principalmente na infância, em idade abaixo de 12 anos. Esse transtorno é caracterizado normalmente pelo medo da separação de entes queridos (principalmente os pais) ou pesadelos contínuos relacionados com essa situação. Entretanto, também pode estar relacionado com o medo de se perder ou ser sequestrado, ou ainda de dormir fora de casa, entre outras situações corriqueiras. Essa fobia pode levar a sintomas como dor de cabeça e palpitações. Para que seja caracterizado o transtorno de ansiedade de separação a perturbação deve estar ocorrendo por pelo menos quatro semanas em crianças e adolescentes e seis meses em adultos, de modo a cronicidade ter participação importante na classificação dos transtornos de ansiedade (*DSM-5*, 2013).

Mutismo seletivo: Ocorre normalmente na infância, sendo caracterizado pela timidez ou medo de falar em situações determinadas. Esta timidez ou aversão, na maioria das vezes acompanhada de ansiedade, acaba interferindo na educação e na interação social de um indivíduo em formação pessoal e de caráter. Para uma ampla caracterização, a duração do distúrbio deve ser de pelo menos um mês para a maioria dos casos (*DSM-5*, 2013).

Fobia Específica: medo de algo específico como um objeto, ente animado ou inanimado ou mesmo de uma situação, como por exemplo, medo de animais, elevador, de voar ou de receber injeção, provocando quase sempre um medo imediato, sendo esse desproporcional a situação real e persistente por mais de seis meses (*DSM-5*, 2013).

Transtorno de Ansiedade Social (Fobia Social): caracteriza-se pela aversão do indivíduo às pessoas e lugares públicos, por imaginar que terá um comportamento impróprio ou que será humilhado pelas pessoas defronte outras. O medo é desproporcional a ameaça da situação social real, causando grande sofrimento e problemas sociais para as pessoas que dele sofrem por um período superior a seis meses (*DSM-5*, 2013).

Transtorno de Pânico: É um medo ou desconforto intenso que leva o indivíduo a um repentino de pânico. Para que seja caracterizado o transtorno do pânico, a perturbação deve provocar na pessoa, quatro ou mais dos seguintes sintomas: Palpitações, sudorese, tremor, sensação de sufocamento ou asfixia, dor no peito, náuseas, tontura, calafrios, parestesias, sensações de despersonalização ou

desrealização, medo de enlouquecer e medo de morrer. Também deve estar associado a preocupações adicionais e/ou mudança de comportamento, em geral por pelo menos um mês (DSM-5, 2013).

Agorafobia: Marcado pelo medo ou ansiedade sobre duas (ou mais) das seguintes situações: utilizar transporte público, estar em espaços abertos ou fechados, estar fora de casa e sozinho, ficar na fila ou estar envolto na multidão. Agorafobia quase sempre provoca medo ou ansiedade, sendo esses exagerados e fora de proporção comparadas a uma situação de perigo ou ameaça real. Diante dessa situação o indivíduo acaba evitando situações que lhe possam trazer a tona o medo/ansiedade, o que pode trazer problemas sociais e sofrimento, que para classificação devem perdurar por pelo menos seis meses (DSM-5, 2013).

Transtorno de Ansiedade Generalizada: Ansiedade excessiva sobre determinada situação ou evento rotineiro, que ocorre na maioria dos dias e de maneira incontrolável. A intensidade, duração ou frequência da ansiedade e preocupação, como em muitas dos outros tipos são fora de proporção mediante ao real acontecimento. Além disso, deve estar associada a três ou mais dos seguintes sintomas: Inquietação, tensão ou nervosismo, fadiga, dificuldade de concentração, irritabilidade, tensão muscular e insônia por tempo prolongado (DSM-5, 2013).

Substância Transtorno de Ansiedade / Induzido por Medicação: Ataques de pânico ou de ansiedade após a intoxicação ou a retirada súbita de alguma substância química, trazendo perturbação, sofrimento ou prejuízo no lidar social, ocupacional, ou outras áreas importantes do cotidiano. As principais substâncias envolvidas nesse tipo transtorno são: Álcool, cafeína, maconha, fenciclidina, opióides, sedativos, hipnóticos, ansiolíticos, anfetaminas, cocaína, entre outras (DSM-5, 2013).

Transtorno de Ansiedade devido à outra condição médica: É a consequência fisiopatológica direta de outra condição médica, em esquema de co-morbidade. Os sintomas podem incluir: Ansiedade proeminente ou ataques de pânico causando sofrimento ou prejuízo no operar social, ocupacional, entre outros (DSM-5, 2013).

Outro Transtorno de Ansiedade especificado: Quando ocorre transtorno de ansiedade com prejuízo da vida social, ocupacional ou qualquer outro, desde que não satisfaça os critérios para qualquer um dos distúrbios ou classe de diagnósticos de ansiedade descritos anteriormente (DSM-5, 2013).

Transtorno de Ansiedade não especificado: Esta categoria aplica-se a situações onde há os sintomas característicos de ansiedade, porém o clínico opta por não especificá-lo ou ainda quando não há informação suficiente para a feita de um diagnóstico mais específico (DSM-5, 2013).

Os distúrbios de ansiedade juntamente com os distúrbios do humor são as desordens mentais mais comuns (GOODMAN e GILDMAN 2012), sendo que no Brasil, segundo dados da OMS do ano de 2000, a ansiedade foi mais prevalente do que os transtornos do humor, apresentando-se como um problema de saúde pública evidente, como suportado por inúmeros dados estatísticos. Estudos demonstram que cerca de 25% da população global apresentou, apresenta ou apresentará algum tipo ansiedade patológica. De fato, o relatório Mundial da Saúde de 2000 aponta que 22,6% das pessoas no Rio de Janeiro sofrem de ansiedade generalizada (OMS, 2000). Um estudo mais recente, apresentado no Plano Nacional de Saúde Mental 2007-2016 (BRASIL), demonstrou que, em nossa sociedade, esses transtornos são uma das principais causas de incapacidade, sendo responsáveis por quase metade das causas das desordens neuropsiquiátricas.

Anualmente, muito se gasta economicamente com o tratamento da ansiedade. Nos EUA foram estimados para o ano de 1990, gastos de cerca de 64 bilhões de dólares somente com os transtornos de ansiedade, o que representa 31% do total dos custos com a assistência à saúde mental (BARLOW, 2002). Infelizmente, no Brasil, há poucos estudos que representem com plena confiança os índices exatos de prevalência de pessoas afetadas pelos transtornos mentais, incluso ansiedade, e, sobretudo, dos gastos deles consequentes (SANTOS E SIQUEIRA, 2010).

1.2. MECANISMOS NEURAIS/NEUROTRANSMISSORES ENVOLVIDOS NOS TRANSTORNOS DE ANSIEDADE E TRATAMENTO

Hoje com os avanços nos estudos das estruturas cerebrais, áreas neurais e neurotransmissores envolvidos na ansiedade, sabe-se que a ansiedade e medo são controlados pela amígdala, estrutura cerebral que se localiza próxima ao hipocampo e que tem conexões com outras áreas cerebrais, tais como, o córtex pré-frontal e orbitofrontal, que controlam a afetividade e o sentimento de medo (PACAK e

PALKOVITS, 2001); (SVED, CANO, *et al.*, 2002); (MORILAK e FRAZER, 2004). A amígdala apresenta conexões com áreas motoras envolvidas nas respostas a essas sensações, como por exemplo, o córtex cingulado e o tronco cerebral. Essas últimas áreas controlam as atividades motoras ligadas à fuga, à luta ou ao congelamento da ação (STHAL, 2012). Apesar de a amígdala ser bastante importante na ansiedade, ela não é a única estrutura centralizada no desenvolvimento e manutenção do transtorno. O sistema límbico (septo, hipocampo, giro do cingulado, porções do hipotálamo, amígdala e outras porções do lobo temporal), córtex pré-frontal medial, bem como suas conexões via sistemas monoaminérgicos (serotonina, norepinefrina e dopamina) e outras áreas do tronco cerebral (como a substância cinzenta periaquedutal dorsal), também estão envolvidas nos processos e nos tratamentos da ansiedade (FUNCHS e WANNMACHER, 2012).

A ansiedade também está relacionada com alterações neuroquímicas moduladas por neurotransmissores como a serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA), dopamina, noradrenalina e glutamato, além dos canais iônicos sensíveis a voltagem, como alguns dos canais de sódio e de cálcio. Os mecanismos que envolvem esses neurotransmissores se fazem importantes e evidentes à medida que muitas drogas ansiolíticas agem sobre neurotransmissores específicos para aliviar os sintomas da ansiedade, quando se considera o tratamento da desordem (KAPCZINSKI, QUEVEDO e IAQUIERDO, 2011).

A seguir será feita uma breve revisão dos neurotransmissores, suas ações no sistema nervoso ligadas a ansiedade e os principais fármacos envolvidos no controle dos transtornos de ansiedade.

Apesar da participação de outros neurotransmissores, acredita-se que o GABA e Glutamato tenham participações preponderantes na ansiedade. O excesso de glutamato na fenda sináptica pode causar hiperexcitação e levar a desordens psiquiátricas ou neurológicas como ataque de pânico, psicose, epilepsia, ansiedade e outros, levando ainda a danos permanentes de regiões cerebrais como os que ocorrem na esquizofrenia (STHAL, 2012). Por outro lado, o GABA exerce papel regulador de vários neurônios, incluindo os da amígdala e os das alças corticoestriadas-talâmica-corticais (CSTC), que como sabido também se relacionam com transtornos da ansiedade (BREMNER, LICINIO, *et al.*, 1997). O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC) de mamíferos e sua ação se dá pela ligação a receptores ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) e metabotrópicos específicos (GABA_B), alterando a

permeabilidade ao cloreto no caso dos primeiros tipos de receptores, e então, o potencial de ação dos neurônios pós-sinápticos para valores de limiar hiperpolarizados (GOLAN, ARMEN, *et al.*, 2009).

Mesmo antes de o homem ter os conhecimentos sobre as áreas cerebrais e os neurotransmissores envolvidos nos transtornos de ansiedade, esse já se valia de substâncias químicas na tentativa de eliminar ou aliviar os sintomas e o sofrimento gerados pela ansiedade excessiva. O ansiolítico mais antigo que se tem notícia e provavelmente o mais utilizado até hoje, muito embora não em escala terapêutica, é o álcool etílico. Entretanto, e desconsiderando o empirismo, sua aplicação como tratamento médico da ansiedade é contraindicada, pois possui baixo índice terapêutico, causa interferência psicomotora e dependência, potencializa outros depressores do SNC, além de inúmeros outros inconvenientes quando, sobretudo, em dosagens mais altas (GOLDBERG, 1984).

Os primeiros medicamentos a serem usados no tratamento da ansiedade foram os sais de bromo no século XIX. No século seguinte com o aparecimento dos derivados da maloniluréia, conhecidos como barbitúricos, os sais de bromo deixaram de ser usados, pois causavam vários efeitos colaterais, além do clássico efeito tóxico conhecido como Bromismo (GRAEFF e GUIMARÃES, 2000). Deste modo e também, o primeiro tratamento farmacológico moderno da ansiedade patológica a atuar via mecanismo GABAérgico foram os barbitúricos no início do século XX, seguidos dos benzodiazepínicos. Tanto os barbitúricos quanto os benzodiazepínicos, muito embora através de sítios diferentes, agem sobre os receptores GABA_A aumentando as condutâncias de cloreto induzidas pelo GABA. Os barbitúricos aumentam a duração temporal de abertura do canal de cloreto acoplado ao receptor, enquanto os benzodiazepínicos aumentam a frequência de abertura. Os barbitúricos ainda e quando em altas concentrações abrem os canais iônicos acoplados aos receptores na ausência de GABA e parecem exercer um efeito antagonista em receptores glutamatérgicos tipo AMPA (SIEGHART, RAMERSTORFER, *et al.*, 2012)

Os barbitúricos foram usados por muito tempo e foram substituídos gradativamente pelos benzodiazepínicos por esses serem estes últimos mais eficazes, terem maior poder terapêutico e causarem menor nível de dependência. Os benzodiazepínicos, particularmente quanto ao efeito hipnótico, tem mostrado melhor índice terapêutico que os barbitúricos (CARLSON e ROY-BYRNE, 2002; SADOCK e SADOCK, 2002). Além disso, os barbitúricos como o fenobarbital, em adição a sedação

e a hipnose, podem também causar anestesia geral, coma e até morte, dependendo da dose utilizada, o que implica mais uma vez em índice terapêutico desvantajoso quando comparados aos benzodiazepínicos (GRAEFF e GUIMARÃES, 2000).

A serotonina age na amígdala e é o principal neurotransmissor envolvido com os transtornos depressivos. Como transtornos de ansiedade e depressivos podem em algumas circunstâncias se sobreporem, algumas drogas, que agem na modulação deste neurotransmissor, podem ser úteis no tratamento de transtornos ansiosos, além daqueles ligados a depressão (RIBEIRO, KAPCZINK, *et al.*, 2000). Alguns fármacos ansiolíticos indiretos podem aumentar a atividade de serotonina pelo bloqueio de seu transportador (SERT), como é o caso dos inibidores de receptação de serotonina (ISRS) e os inibidores de recaptção de serotonina e noradrenalina (IRSN). A Buspirona é um derivado piperazinil pertencente à família das azapironas, não tem afinidade por receptores benzodiazepínicos e não atua diretamente sobre a neurotransmissão GABAérgica. A Buspirona atua como agonista parcial nos receptores serotoninérgicos (5-HT_{1A}) e tem afinidade por receptores dopaminérgicos D₂-símile (RD₂), sendo amplamente usado como um fármaco ansiolítico nos últimos anos (LIMA, MACÊDO, *et al.*, 2002). A buspirona apresenta grandes vantagens em relação aos benzodiazepínicos, uma vez que ela não afeta a atividade motora, não causa síndromes de abstinência e não causa depressão no SNC mesmo com a presença de álcool (TUNNICLIFF G, 1991); (GRUNDMANN, NAKAJIMA, *et al.*, 2007). Contudo, há de se ressaltar que também possui algumas desvantagens, na medida em que também apresenta efeitos colaterais, que incluem náuseas, cefaleia e tontura. Além disso, necessita em geral ser administrada 3 vezes ao dia, além do que só começa a diminuir os sintomas da ansiedade cerca de duas semanas após o início do tratamento, o que pode prejudicar a adesão terapêutica (CALANDRE e IRIBAS, 1992); (CONNOR e DAVIDSON, 1988); (LIEBOWITZ, SCNEIER, *et al.*, 1992).

As catecolaminas aumentam durante as síndromes de ansiedade e nas fobias (LIEBOWITZ, SCNEIER, *et al.*, 1992). A liberação excessiva de noradrenalina pelo *locus coeruleus* estimula a amígdala. Esse estímulo se dá porque esse neurotransmissor se liga a receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$ responsáveis pela liberação de adrenérgicos da amígdala durante a ansiedade (RUBALCAVA CL, 1994); (TAYLOR FB, 2006). Alguns testes vêm sendo feitos na tentativa de diminuir os efeitos das catecolaminas utilizando antagonistas, bloqueadores dos receptores $\alpha 1$ e $\beta 1$, que agem no sistema nervoso simpático e periférico, causando redução da ação das catecolaminas, e

consequentemente, fazendo com que haja uma diminuição da contractilidade e da velocidade cardíaca (FUNCHS e WANNMACHER, 2012). Estudos recentes com prazosina e propranolol demonstram que esses agem diminuindo a ansiedade (LAURENCE e BRUNTON, 2012); (PAGOTTOI, BERGER, *et al.*, 2012) e com vantagens em relação aos tradicionais benzodiazepínicos, por não causarem sonolência e nem dependência. Contudo, podem causar vasoconstrição das artérias coronárias dentre outras desvantagens, o que pode limitar o uso clínico (LIEBOWITZ, GORMAN, *et al.*, 1985); (BECHELLI e NARDI, 1988)

A dopamina como já dito também esta envolvida nos transtornos de ansiedade. Recentemente vem sendo usado no tratamento da ansiedade novos antipsicóticos, tais como a clozapina. As ações desta droga se dão em diferentes sistemas neurotransmissores, incluindo o bloqueio seletivo de receptores dopaminérgicos. Elas também produzem menos efeitos extrapiramidais, devido ao seu antagonismo sobre os receptores serotoninérgicos 5HT2 ou dissociação rápida de receptores dopaminérgicos D2 (STAHL, 2003). A clozapina também vem sendo usada como co-adjuvante com SSRIs e outros antidepressivos (RAVINDRAN e STEIN, 2010), porém devem ser tomadas certas precauções no uso dessa substância, pois, não há definição clara da atividade antidepressiva e ansiolítica. Também deve ser chamada a atenção para seus efeitos secundários, que incluem: sonolência, déficit cognitivo, discinesia e possível catatonia (MUSCATELLO, SPINA, *et al.*, 2012).

Quanto aos glicocorticóides, o excesso de fator ou hormônio liberador das corticotrofinas (CRF) leva à depressão, ao transtorno de ansiedade ou ao episódio depressivo maior (NETO, GAUER e FURTADO, 2003). Alguns tratamentos utilizam antagonistas de glicocorticóides, que competem com o cortisol e evitam atrofia do hipocampo por retroalimentação negativa do eixo Hipotálamo-Hipófise (HPA). Estudos em modelos animais bloqueando receptores de vasopressina V1b parecem ajudar em situações de estresse onde há liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e glicocorticoides (STHAL., 2012). Estudos em humanos com uma nova classe dos medicamentos chamados de “vaptans”, que são antagonistas seletivos do receptor para vasopressina V1b, parecem ter efeitos benéficos no tratamento de distúrbios psiquiátricos, incluindo depressão e ansiedade, a despeito da necessidade de mais estudos (SERRADEIL-LE GAL, (DECAUX, SOUPART e VASSAR, 2008).

Em que pese à diversidade de alvos moleculares ligados aos diferentes neurotransmissores supracitados e ainda a existência de diferentes alternativas

terapêuticas, a busca por novos tratamentos é fato bastante discutido entre os pesquisadores. Além de uma busca por alternativas mais seguras, é imperativo que as novas alternativas sejam obviamente efetivas ou mais efetivas que a contraparte atual, ao mesmo tempo em que a busca por novas alternativas pode ajudar na descoberta de novas abordagens para o entendimento da ansiedade e outras desordens neurológicas (COELHO, *et al.*, 2006).

Portanto, podemos resumir que apesar da importância médica dos ansiolíticos disponíveis no mercado ou em estudos, ainda muito há de se fazer para chegarmos a uma droga que atue isoladamente nos sintomas da ansiedade, sem causar efeitos indesejados. A maioria dos medicamentos encontrada no mercado apresenta algum tipo de ação secundária, como dependência psicológica e/ou perda de memória, e/ou irritabilidade, e/ou alterações do sono, e/ou problemas de ordem social e afetiva, entre outros. Por essas razões novos esforços se dão na busca por novos fármacos de menor preço, que causem menos dependência, que sofram menos interações com outros medicamentos, que produzam menos efeitos colaterais que as contrapartes atuais, ou ainda que possam tratar pacientes que apresentem refratariedade às drogas disponíveis no mercado, o que representaria um avanço na medicina, sobretudo em termos da efetividade de tratamento.

Nesse sentido, uma forma alternativa aos medicamentos ansiolíticos convencionais é o uso de plantas medicinais, na forma de fitoterapia ou como fontes primárias de novos fármacos. Atualmente estima-se que cerca de 25% a 30% de todas as drogas utilizadas como agentes terapêuticos são na verdade derivados de produtos naturais (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR & MELLO, 2008). Sabe-se que, o desenvolvimento dos fitoterápicos representa um mercado rentável, tanto em países industrializados quanto em países em desenvolvimento. Isso pode ser evidenciado pelas montas financeiras relatadas para este setor da economia. Na década de 90, o uso de fitoterápicos disseminou-se intensamente no mercado mundial, sendo que em 1997 atingiram um faturamento de US\$ 12,4 bilhões. Em 2003 esse montante chegou à ordem de cerca de US\$ 22 bilhões, com um crescimento de 12% ao ano (SAAB, 2001, *apud* BRASIL 2003). No caso do Brasil, a estimativa em 2001 era de que US\$ 550 milhões do faturamento da indústria farmacêutica brasileira eram oriundos do comércio dos fitoterápicos, aliado a um crescimento progressivo de 10% ao ano para o mercado deste tipo de produto (KNAPP, 2001; GUERRA & NODARI, 2003). Na Europa e Estados Unidos, esses números são ainda mais consideráveis. Dados do ano 2000

mostram que na Europa esses valores atingiram 8,5 bilhões de dólares e nos Estados Unidos chegaram a 6,3 bilhões de dólares (SIMÕES & SHENKEL, 2002).

Uma característica da biodiversidade é a distribuição desigual de seus componentes quando considerado o quesito geográfico. Os países em desenvolvimento contemplam cerca de 67% das plantas medicinais conhecidas, uma riqueza ainda a ser explorada (ALONSO, 1998). Pela sua abrangência territorial e variedades de climas e solos, o Brasil encontra-se em posição privilegiada, pois possui a maior biodiversidade genética vegetal do mundo, com aproximadamente 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000 (DIAS, 1996). Esse número representa entre 10 a 15% das espécies vegetais estimadas do mundo. Toda esta grandeza de soberania é destacada pelo Ministério da Saúde, que coloca o estudo de plantas medicinais como uma das prioridades de investigação em saúde (BRASIL, 2008). Assim, a exploração sustentável de novas fontes de fármacos, sejam eles ansiolíticos ou não, é assunto de relevância para soberania nacional e para o desenvolvimento das áreas de saúde e do país como um todo, principalmente quando se considera o valor agregado que a biotecnologia pode dar aos produtos que sejam de fato inovadores (GELFUSO, ROSA, *et al.*, 2013)

Apesar do mercado rentável e em crescimento e do aumentado interesse governamental e da sociedade, o uso de plantas medicinais na forma popular ou em esquema de fitoterapia merece também um olhar sob reservas e ressalvas.

Em primeiro lugar é preciso que especialistas de diferentes setores das áreas médicas tenham pleno conhecimento sob o assunto a fim de evitar um entusiasmo exagerado para os potenciais benefícios dos produtos naturais quanto para que o potencial efetivo destes produtos não seja desperdiçado por conta de julgamentos superficiais e relutantes sem causa-efeito apropriada (ANDREATINI, *et al.*, 2001; KINRYS, *et al.*, 2009; GELFUSO, ROSA, *et al.*, 2013).

Questões técnicas são preocupantes quanto avaliamos o estado de arte do uso de produtos naturais e fitoterápicos no Brasil e no mundo. Neste contexto, tem-se percebido que apesar de melhoras nas últimas décadas, o controle de qualidade dos produtos fitoterápicos é ainda relativamente frouxo quando comparado aos produtos farmacêuticos da alopatia, sobretudo no que tange a reprodução da quantidade de efeito terapêutico ou mesmo tóxico de lote para lote ou entre diferentes fabricantes (GELFUSO, ROSA, *et al.*, 2013). O problema ainda é maior neste mister quando pensamos no uso caseiro de plantas medicinais. Para que este problema seja resolvido

ao menos na indústria de fitoterápicos é importante que marcos regulatórios sejam cada vez mais rígidos quando se considera a necessidade de marcação fitoquímica. Através de métodos analíticos cada vez mais sofisticados é importante que extratos vegetais sejam produzidos considerando cada vez mais a reprodutibilidade esperada para seus efeitos gerais, na medida em que o uso de extratos padronizados minora os problemas causados pelos conhecidos efeitos da variação de metabólitos secundários em virtude da influência direta e indireta sofrida pelas plantas em termos de fatores bióticos e abióticos (GELFUSO, ROSA, *et al.*, 2013).

Outro problema se diz da comprovação de eficácia e toxicidade de tais produtos. Muitas plantas vêm sendo usadas secularmente na prática caseira ou mesmo comercializadas para fins medicinais sem que nenhuma validação científica de eficácia tenha tomado corpo ao menos em modelos animais ou até mesmo através de experimentos *in vitro*. Pior cenário ainda se refere a falta de verificação científica da toxicidade destes produtos, sobretudo quando utilizados em escala crônica. No que tange aos estudos clínicos em humanos para muitos dos fitoterápicos outros problemas são conhecidos (GELFUSO, ROSA, *et al.*, 2013). Apesar de não ser a regra, a literatura científica é em geral enviesada para demonstração apenas dos resultados positivos em detrimento daqueles que efetivamente mostram ineficácia da planta para algumas de suas potenciais propriedades terapêuticas até então acreditadas (ERNST, 2006; KINRYS, *et al.*, 2009). Além disso, e para estes casos, são costumeiramente reportadas falhas metodológicas nas diferentes triagens clínicas, como tamanho de amostra, efetiva comparação com placebo e controles ou mesmo quanto a análise estatística, o que torna o cenário preocupante (ERNST, 2006)

Finalmente, erros de identificação taxonômica das plantas, erros de coleta e da correta parte da planta a ser utilizada para um determinado fim terapêutico, coloca o uso de plantas medicinais na prática caseira ou mesmo em escala industrial sob necessidade de vigilância epidemiológico-sanitária contínua.

Os problemas técnicos acima citados não diminuem a potencialidade dos produtos naturais quando para uso medicinal, mas colocam em evidência um problema de saúde pública a ser considerado com cuidado, sobretudo, quando no momento em que a população necessita de alternativas terapêuticas que sejam seguras, mas também realmente eficazes quando usadas de forma sucedânea ou complementar ao uso de medicamentos convencionais, incluindo os ansiolíticos.

1.3. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae

A planta *Achyrocline satureioides* pertence à família Asteraceae, sendo este grupo o mais numeroso dentro das angiospermas, compreendendo cerca de mil e cem gêneros e vinte e cinco mil espécies (BOTTEGA, 2011). A planta é conhecida popularmente por macela-do-campo, macelinha, macela de travesseiro, marcela, carrapichinho-de-agulha, camomila nacional, alecrim-de-parede, marcela-da-terra, macela-do-sertão, marcela-galega, paina, dentre outros nomes conforme as diferentes culturas regionais (LORENZI & MATOS, 2008). É uma planta arbustiva, perene e nativa da América do Sul e encontrada em todos os países desse continente, especialmente em solos arenosos e basálticos.

A reprodução se dá através de suas sementes, que são pouco exigentes em relação ao solo e à água. A planta atinge de 40 à 80 cm de altura, forma um emaranhado de troncos com o mesmo sistema radicular, conhecido como touceira; as folhas são longas, finas e de cor verde-claro e com muitos pêlos. Seu pequeno fruto é do tipo aquênio, seco e de semente única. Floresce no mês de março (S-Brasil) ou em setembro (NE-Brasil) e suas pequenas flores de cor amarela, se reúnem formando inflorescências que dão grande destaque visual a esse arbusto (Figura 01) (PEREIRA *et al.*, 2006). Essas liberam um aroma agradável e são colhidas normalmente no início da floração para serem utilizadas para fins medicinais (WIEST, *et al.*, 2009).



Figura 01: Inflorescência de *A. satureioides* (Fonte: <http://tudolevaapericia.blogspot.com.br>).

A macela encontra-se em abundância no estado do Rio Grande do Sul, onde é bastante conhecida. Neste estado brasileiro, a macela é usada com mais frequência em

relação aos demais estados brasileiros. De fato, o projeto de lei estadual Nº 11858 de 2002, instituiu *A. saturoioides* como planta medicinal símbolo do estado gaúcho. Nessa região as inflorescências são colhidas folcloricamente e em abundância na Sexta-Feira Santa, onde segundo a crença local, o aroma e poder terapêutico da planta são máximos (MOTA, 2011).

Segundo levantamento fitoquímico feito por Retta, *et al.*, (2012), as partes aéreas (peças e inflorescências), são constituídas de polifenóis e flavonóides que incluem: ácido caféico, dois ésteres de 3,4-dihidroxibenzil álcool-4-glucósido com ácido cafeico e ácido protocatecuico, respectivamente, galangina, galangina-3-metil éter, a quercetina, éter quercetina- 3-metil e gnafalina isognafalina, quercetagina, quercetina-3-metil-éter-7-diglucosideo, tamarixetina, tamarixetina-7-glucósideo, o ácido 3-cafeoilquínico, 4-cafeoilquínico, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,4- dicafeoilquínico, 3,5-dicafeoilquínico, ácido 4,5-dicafeoilquínico, luteolina, scoparol, 5,8-di-hidroxi-3,7-dimethoxyflavone, 3-,5,7,8-trimetoxiflavona, 7-hidroxi-3-5-8- trimetoxiflavona e uma nova chalcona: Achyrobichalcona. Também são citados como compostes fixos cumarinas, polissacárideos, aquirofuranos, lactonas e poliacetilenídeos (RETTA, *et al.*, 2012).

Quanto a composição do óleo essencial da *A. saturoioides*, constatou-se que seu componente majoritário é o alfa-pineno, que varia entre 41 e 78%. Esses valores foram obtidos a partir das inflorescências de amostras de diversas partes do Brasil submetidas a hidrodestilação, seguida de análise feita por CG/EM (LAMATY, *et al.*, 1991). Resultados semelhantes foram descritos por Bauer, *et al.*, (1992) e por Lorenzo, *et al.*, (2000) em amostras de plantas do Brasil e do Uruguai. Cezarotto *et al.*, (2011) descreve que essa variação na composição e também no rendimento da obtenção de óleo podem se dar pelo período de coleta das plantas e variações geoclimáticas, dentre outros motivos.

A *A. saturoioides* é amplamente utilizada na medicina popular. Dentre as suas diversas propriedades destacam-se a antiinflamatória e analgésica, a hipoglicemiante, aquelas relacionadas com o tratamento de distúrbios gastrointestinais (diarreia, disenteria e dor de estômago), a digestiva e hepatoprotetora, a antitussígena e antigripal, aquelas contra infecções das vias respiratórias e contra hipertensão, e claro, aquelas relacionadas ao Sistema Nervoso Central (SNC), como as atividades ansiolítica, calmante, sedativa e no combate as crises convulsivas de origem epilética (ROCHA, *et al.*, 1994; HNATYSZYN, *et al.*, 1999; VIANA, *et al.*, 2000; LORENZI, *et al.*, 2002;

RITTER, 2002; SILVA, 2007). A planta é ainda usada na indústria de cosméticos em clareantes capilares e em tônicos para revigoração da circulação capilar e contra a queda de cabelos, destacando ainda mais seus diferentes potenciais farmacêuticos (TESKE; TRENTINI, 2001).

A utilização da *A. saturoioides* na medicina popular se faz, principalmente, na forma de infusos ou decoctos de inflorescências administrados pela via oral. Entretanto e segundo WAGNER (1992), é também comum o uso na forma de aromaterapia. De fato, em várias regiões, as inflorescências da planta são utilizadas como forros ou estofos para travesseiros e estofados, sendo os mesmos, produzidos artesanalmente em várias comunidades do Rio Grande do Sul e de outras regiões do Brasil (SILVA, MACHADO E RITTER, 2007). A venda desses artesanatos é uma fonte de renda para índios da tribo Pataxó na Bahia (PEGORARO, FILHO, *et al.*, 2006). Entretanto, os travesseiros são também explorados por pequenas indústrias espalhadas por todo o Brasil. Facilmente podemos encontrar esses travesseiros feitos de “Macela” de vários fabricantes diferentes em diversos sites na internet. Os anúncios sempre vêm acompanhados da promessa de garantir uma noite de sono tranquilo, explorando, pois seus potenciais benefícios calmantes e ansiolíticos. Essas inflorescências liberam um aroma agradável que, segundo descrito, agem como calmante/ansiolítico e facilitam o sono. Esse uso é tão comum que podemos achar relatos populares deste mister em várias obras literárias, como em trecho do romance de Guimarães Rosa onde o autor escreve: “*Mamãe: Travesseiro com macela: cheiro suave. Travesseiro e colchão para meninos pequenos: recheio de perpétuas (flor), seca (sic): a roxa e a branca*”.

Ainda dentro do panorama folclórico, Monteiro Lobato em seu livro infantil: *Reinações de Narizinho*, também aborda o uso tradicional do estofamento com a utilização da Macela. Em vários diálogos o autor esclarece que a boneca Emília (apesar de irrequieta) é estofada com Macela, assim como os travesseiros da roça.

“— Então é porque sou de macela — disse.”

“Em dois minutos, com um bocado de macela e uma agulha com linha ela cura Emília para o resto da vida.”

“— Isso Também não é resposta. Este travesseiro é de macela e entende as formigas tanto quanto eu.”

Muitas das propriedades terapêuticas da *A. satureioides* já foram comprovadas, entretanto, outras como o potencial efeito ansiolítico do óleo essencial carecem enormemente de comprovação científica (Retta, *et al.*, 2012). Em que pese a carência de estudos para validação de atividades da *A. satureioides* no SNC, a ação sedativa central da planta foi confirmada por Simões, *et al.*, (1985), que testou doses de 250 e 500 mg/kg, via oral e i.p. de extrato aquoso de folhas, porém não do óleo essencial e inflorescências, entidades mais relacionadas ao uso da planta por aromaterapia, o que em geral para ações preditas pela população no que tange ao SNC é mais comum. A propriedade anticonvulsivante do extrato também está descrita e está relacionada com substâncias não voláteis, das quais inositóis, fenilpropanóides e flavanóides que, ao que parecem, atuam via GABAérgica (VIANA *et al.*, 2000).

Contudo, nada é descrito acerca de uma possível atividade ansiolítica do óleo essencial de inflorescências, em que pese sua conhecida ação no SNC pelos relatos populares na forma de aromaterapia, onde o óleo deve ter maior contribuição através de compostos voláteis do que aqueles fixos da planta como um todo, demonstrando desta forma a importância etnofarmacológica e mesmo biotecnológica deste tipo de trabalho.

Finalmente é preciso destacar que a comprovação ou o rejeitar racional do conhecimento popular para o uso de plantas medicinais é de função pública ao intervir em um grande problema epidemiológico-sanitário quando considerado o uso de plantas sem a devida validação farmacológica ou toxicológica, o que permite inadvertidamente que pacientes sejam submedicados, não tratados ou pior, intoxicados.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o de estudar os efeitos centrais do óleo essencial de inflorescências de *A. satureioides* tendo em vista principalmente os seus potenciais efeitos ansiolíticos para investigação dados etnofarmacológicos importantes, comprovando ou descartando, pois, a validade para parte de seu uso popular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Obter quantidades suficientes do óleo essencial de inflorescências de *A. satureioides* através de hidrodestilação;

-Analisar em detalhes o perfil fitoquímico do óleo por meio de Cromatografia Gasosa acoplada de Espectrometria de Massas (CG-EM);

- Avaliar a potencial atividade ansiolítica de diferentes doses do óleo essencial de inflorescências de *A. satureioides*, via intracereboventricular em ratos, através dos testes clássicos de ansiedade como o Labirinto em Cruz Elevado (LCE), Campo Aberto (*Open Field*) e Teste de Transição Claro-Escuro;

- Avaliar os efeitos de diferentes doses do óleo essencial de inflorescências de *A. satureioides*, via intracereboventricular em ratos, nos testes de *Open Field* e *Rotarod* para possível observação de sedação e/ou impedimento locomotor dos animais em teste.

OBJETIVO ESPECIAL: *Declara-se aqui que o aluno Luciano José Ramos é bolsista da Secretaria de Educação do Estado de São Paulo, e em atendimento às exigências internas do órgão, o aluno deverá em paralelo a este projeto desenvolver material que sirva de contingente pedagógico e/ou científico para estudantes do Ensino Fundamental e Médio, dentro de uma estratégia de ensino aprendizagem focada no currículo oficial do Estado de São Paulo. Este trabalho poderá ser dar na forma de vídeos educativos, livretos ou apostilas, sendo de exclusiva responsabilidade autoral do aluno.*

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA DA PLANTA, EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

Exemplares de *A. satureioides* foram coletados no Mês de abril na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. A identificação botânica da planta foi feita por autoridade competente e uma exsicata foi depositada no Herbanário da Unidade de Biotecnologia-UNAERP (Protocolo: 1533). Três quilos de inflorescências livres de sujidades visíveis foram devidamente processados e submetidos à hidrodestilação simples, para obtenção de 900 microlitros do óleo essencial, quantidade suficiente para realização de todos os bioensaios farmacológicos descritos abaixo.

A análise da composição do óleo essencial foi feita usando de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Brevemente, o equipamento utilizado foi aquele disponível em nossa Unidade de Biotecnologia (Varian, Saturn 2100T) sendo as condições de análise as seguintes: Coluna capilar: DB-5 (30 m x 0,25mm x 0,25µm); Injetor: 240 °C; Detector: 230 °C; Impacto de Elétrons: 70 eV; Gás de arraste: He; Fluxo: 1,0 mL/min.; Split: 1/20; Programa de Temperatura: 60°C – 240°C, 3°C/minuto; Volume de Injeção: 1 µL de óleo.

Os resultados foram registrados e a identificação e a quantificação relativa dos componentes químicos do óleo realizadas, sendo a identificação efetuada através da comparação dos espectros obtidos com o banco de dados do sistema CG-EM (Nist 62 lib.) e índice de retenção de kovats (Mc LAFFERTY, 1989; ADAMS, 1995).

3.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos com peso entre 200 e 250 g fornecidos pela empresa ANILAB (Paulínia-SP). Foram respeitados os procedimentos relativos ao uso de animais de acordo com as normas estabelecidas no Manual de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, aprovado junto à Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, evitando-se dor e estresse desnecessários aos animais. O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética da UNAERP, tendo sido aprovado sob número de serviço 043/2012.

3.3. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais receberam uma anestesia geral com Cloridrato de Cetamina 10% (Agener União) e Xilazina (Hertape Calier) nas doses de 10mg/kg e 8mg/kg (via i.p.), respectivamente, sendo em seguida posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting-Standard). Também foi aplicada anestesia local com cloridrato de lidocaína 2% via subcutânea. Após a anestesia, iniciou-se a cirurgia com corte do couro da cabeça do animal, de maneira a expor o crânio que foi perfurado para posicionamento da cânula guia com 15 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro. A cânula foi posicionada nas seguintes coordenadas: 0,9 cm ântero-posterior, 1,6 cm meso-lateral e 3,4 cm dorso-ventral, devendo, pois, atingir o ventrículo lateral direito de cada rato, conforme descrito por PAXINOS e WATSON, (1997).

Uma segunda perfuração também foi feita em posição paralela à primeira, para fixação de um parafuso, que serviu como apoio da resina de acrílico auto polimerizante (Clássico LTDA) protetora do crânio submetido à cirurgia. Por fim, a cânula foi intencionalmente obstruída durante a recuperação cirúrgica dos ratos (07 dias) até o momento em que foram feitos os bioensaios propriamente ditos, donde se fazia a retirada de cada mandril obstrutor da cânula.

3.4. GRUPOS DE ANIMAIS, DOSES E VIAS DE ADMINISTRAÇÃO PARA OS ENSAIOS DE LCE, CAIXA CLARO/ESCURO E CAMPO ABERTO.

Os animais foram divididos em grupos controles e experimentais ($n = 6-8$). Animais controles negativos receberam 3 μL solução salina 0,9% (p/v) administrada via intracerebroventricular (i.c.v.). Animais do grupo controle positivo receberam diazepam (DZP) na dose de 2 mg/Kg via i.p, e os animais dos grupos experimentais receberam diferentes volumes do óleo essencial de *A. saturoioides* via i.c.v. (0,5, 1 ou 2 μL). As administrações de diazepam, salina e dos diferentes volumes de óleo foram realizadas 30, 10 e 10 minutos, respectivamente, antes da realização dos bioensaios propriamente ditos, sendo a velocidade de injeção a 1 μL /minuto, quando i.c.v.

Todos os bioensaios descritos abaixo foram gravados e as gravações disponibilizadas para análises posteriores e consulta pública de dados no laboratório.

3.5. BIOENSAIO: TESTE DO LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO (LCE)

Aparato: O Labirinto em Cruz Elevado possui uma plataforma central elevada 50 cm do chão e quatro braços, sendo que, dois são fechados (50x12x40 cm) e dois são abertos (50x12 cm). Anteparas laterais curtas ou longas que acompanham os braços abertos e fechados, respectivamente, são importantes para se evitar a queda dos animais, além de criarem ambientes distintos (alto/baixo e claro/escuro) para exploração do comportamento animal.

Seguindo metodologia de PELLOW *et. al.*, (1985) e também a de FLAUSINO *et. al.*, (2007), os animais foram posicionados no centro do labirinto, voltados para o braço fechado e deixados livres para a exploração. Os animais foram observados durante cinco minutos, tendo sido anotados o número de entradas (com as quatro patas) e o tempo de permanência em cada tipo de braço do labirinto (aberto ou fechado). Foram usados como índices de medida de ansiedade o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos.

3.6. BIOENSAIO: TESTE DO CAMPO ABERTO (*OPEN FIELD*)

Aparato: Foi utilizado um Open Field modelo OP0199 (Insight) com uma base em acrílico de 100 x 80 cm sobre fundo branco cercado por uma barreira circular de acrílico transparente (50 cm de altura), sendo que nessa base encontra-se desenhado o campo de teste de 60 cm de diâmetro devidamente dividido em seus quadrantes.

Após imediata passagem pelo teste LCE, animais dos grupos controles e experimentais foram colocados separadamente no centro da plataforma circular. Durante cinco minutos foram analisados: a atividade locomotora, a frequência de “*rearings*” (atividade exploratória) e de “*groomings*” (movimentos de limpeza). Os dados de atividade locomotora deste teste foram avaliados em conjunto com aqueles que foram obtidos pelo teste de *Rotarod*.

3.7. BIOENSAIO: TESTE DE TRANSIÇÃO CLARO-ESCURO

Descrito inicialmente por CRAWLEY E GOODWIN, (1980) e ligeiramente modificado por Costall *et. al.*, (1989) e Bourin e Hascoe, (2003), o teste baseia-se na aversão dos roedores para áreas iluminadas, avaliando o comportamento exploratório espontâneo em resposta a novos ambiente e à luz. Aparato: Foi adaptado um aparelho de Esquiva Ativa (Insight) contendo uma caixa de acrílico nas seguintes dimensões: altura (A) de 25,5 cm x largura (L) de 24 cm x comprimento (C) de 48,5 cm, dividida em dois compartimentos de dimensões de A=25,5 x L=24x C=24 cm, sendo que, um compartimento com as paredes transparentes trata-se daquele dito claro e um compartimento com paredes pretas, o escuro. Entre os compartimentos há uma divisória de acrílico preta com uma abertura de 6,5 x 10 cm para que o animal possa se transferir de um compartimento para o outro, na medida em que faça a exploração do ambiente ou não. O compartimento claro, além de transparente, foi iluminado com uma luz branca artificial (50-60 Hz; 355 mA).

Após imediata passagem pelo teste de Campo Aberto e seguindo metodologia de Flausino, *et. al.*, (2007), cada animal foi posicionado no centro do compartimento iluminado, de frente para a abertura de acesso ao campo escuro. Foi avaliado durante cinco minutos o número de passagens para o campo claro e o tempo gasto neste compartimento do aparato, sendo considerada transição, apenas quando o animal ultrapassasse a abertura de acesso entre os campos claro/escuro, com as quatro patas integralmente.

3.8. BIOENSAIO: TESTE DO ROTAROD

O aparelho utilizado foi um RotaRod (*Acceler Rota-Rod, Jones & Roberts, for rats 7750*; Ugo Basile, Comerio, Italy) com cilindro de 3 cm de diâmetro com rotação de 12 rev/min. Foram registrados os tempos de permanência de cada animal na barra de rolagem durante um período de 1 minuto. Os testes iniciaram 30 minutos após a injeção

de diazepam ou 10 minutos após a injeção de salina e óleo essencial, e os procedimentos foram repetidos durante 90 minutos em intervalos de 15 minutos.

Os efeitos de diferentes doses do óleo essencial sobre a coordenação motora/sedação dos animais foram analisados conjuntamente pelos testes do *Open Field* e *Rotarod* em comparação aos grupos controles. Para os testes de RotaRod os animais foram separados em grupos ($n = 6-8$) da mesma forma que para os testes anteriores, exceto pela variação das doses de óleo (0,25 e 2 μL ; i.c.v) e pelo acréscimo de mais um grupo de ratos controles positivos onde foi injetada uma dose de diazepam na concentração de 5mg/kg também via i.p.

Antes da realização desses testes, mais precisamente, um dia antes do experimento de fato, todos os animais foram devidamente aclimatizados na sala de experimentação e submetidos a 03 sessões de treinamento de 1 minuto cada, nas mesmas condições daquelas que seriam empregadas nos experimentos de fato. Sendo que, no dia da realização do experimento, minutos antes dos ensaios, os animais voltaram ao aparelho e somente aqueles que permaneceram por 1 minuto na barra de rolagem foram selecionados para os testes.

3.9. ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após realização dos bioensaios, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico e em seguida foi feita uma injeção via i.c.v. de 3 μL do corante azul de toluidina, para que a região atingida pela cânula (ventrículo lateral direito) pudesse se corar. Animais que não tiveram o ventrículo lateral direito corado pela aplicação do corante foram descartados do quadro experimental válido.

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS DOS DADOS

Para análise de dados dos bioensaios foi aplicado análise estatística do tipo ANOVA ($p < 0,05$) seguida de pós-teste num comparado entre grupos experimentais e controle.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Kennedy e Wightman, (2011), os óleos essenciais de diferentes plantas são caracterizados pela volatilidade, odor peculiar e solubilidade acentuada em solventes orgânicos. Os óleos essenciais são produzidos em plantas como metabólicos secundários, que não são necessários para a sua sobrevivência imediata, mas cuja síntese permite que a planta interaja com o meio. Isto é de suma importância para a sua sobrevivência em longo termo, notadamente nas funções de defesa e reprodução. Os neurônios do órgão vomeronasal, também conhecido como órgão de Jacobson, são considerados um sistema olfativo dos animais tetrápodes e pode detectar odores e ferormônios, mostrando que, mamíferos e insetos odoríferos, conseguem detectar compostos liberados a partir de plantas ou de outras espécies animais. Sendo assim, os óleos essenciais podem agir como sinalizadores moleculares, induzindo mudanças comportamentais em agentes polinizadores, insetos pragas ou mesmo em organismos mais complexos (KENNEDY e WIGHTMAN, 2011).

Do ponto de vista farmacocinético e a partir da inalação de óleos essenciais, é possível que vários de seus constituintes cheguem ao sangue, atravessem a barreira hematoencefálica e atinjam o SNC de mamíferos (BROOKER, SNAPE, et al., 1997), (PERRY e PERRY , 2006), (BAGETTA , MORRONE, et al., 2010). Esses efeitos sobre o SNC estão ligados às funções ecológicas das plantas, onde elas ao longo da evolução desenvolveram mecanismos adaptativos, para tentar se livrar de predadores como insetos e animais herbívoros ou para atrair insetos polinizadores e animais dispersores de semente, como dito antes. Tais efeitos em diferentes tipos de organismos, inclusive os mais complexos, podem ser explicados pelas semelhanças entre os sistemas nervosos de mamíferos e insetos. Guardados os devidos limites desta interpretação, esses organismos compartilham uma série de semelhanças em termos de neurotransmissores (GABA, glutamato, acetilcolina e outros) usados na comunicação entre neurônios e estruturas receptoras, enzimáticas e transportadoras em diferentes sinapses (KENNEDY e WIGHTMAN, 2011).

Os óleos essenciais têm uma longa história na medicina popular, remontando a era pré-cristã, e ainda são usados terapêuticamente até os dias de hoje em escala cada vez mais aumentada (COOKE E ERNST, 2000). A aromaterapia realizada com o uso de diferentes óleos essenciais vem se firmando cada vez mais como um tratamento terapêutico alternativo, muito embora uma extensa necessidade de comprovação de eficácia e segurança precise ser mais bem estabelecida (KURIYAMA *et al.*, 2005).

Vários autores têm destacado as propriedades da aromaterapia no restabelecimento do bem-estar emocional, redução da depressão, ansiedade e estresse (ATSUMI E TONOSAKI, 2007; EDGE, 2003; KYLE, 2006; LOUIS E KOWALSKI, 2002).

Atualmente aproximadamente 3000 óleos essenciais são conhecidos, sendo desses considerados 300 como de importância comercial, principalmente para as indústrias farmacêuticas (BAKKALI, *et al.*, 2008). Os óleos essenciais são uma mistura de constituintes, particularmente terpenos e terpenóides (terpenos com oxigênio). Os monoterpenos e sesquiterpenos são os principais tipos de terpenos encontrados nos óleos, podendo muitos dos terpenos possuírem funções álcool, éster, fenol, éter e aldeído, sendo o mesmo verdadeiro para compostos aromáticos que também sejam frequentemente encontrados em óleos (BAKKALI, *et al.*, 2008). Sendo assim, as modificações químicas encontradas num esqueleto básico de isopreno ou benzeno dá aos diferentes compostos diferentes funções biológicas, e conseqüentemente, as farmacológicas de interesse biotecnológico.

Em nosso trabalho, as análises fitoquímicas através do CG-EM (Figura 02) identificaram como sendo o composto majoritário presente no óleo essencial de *A. saturoioides* o terpeno alfa-pineno, com 45,49% do total (Tabela 1). Sua estrutura química é mostrada na Figura 03. Independente dos resultados aqui obtidos é relevante salientar que no estudo de fitocomplexos, como se tratam dos óleos essenciais, uma marcação fitoquímica como a providenciada pelo CG/EM é de fundamental importância para a replicação de resultados futuros e ainda no estabelecimento da relação composição química do óleo e potencial ação farmacológica, no que este expediente é também relevante no desenvolvimento de formulações farmacêuticas futuras onde o óleo por ventura possa estar presente, caso obviamente seja ativo (BAKKALI *et al.*, 2008).

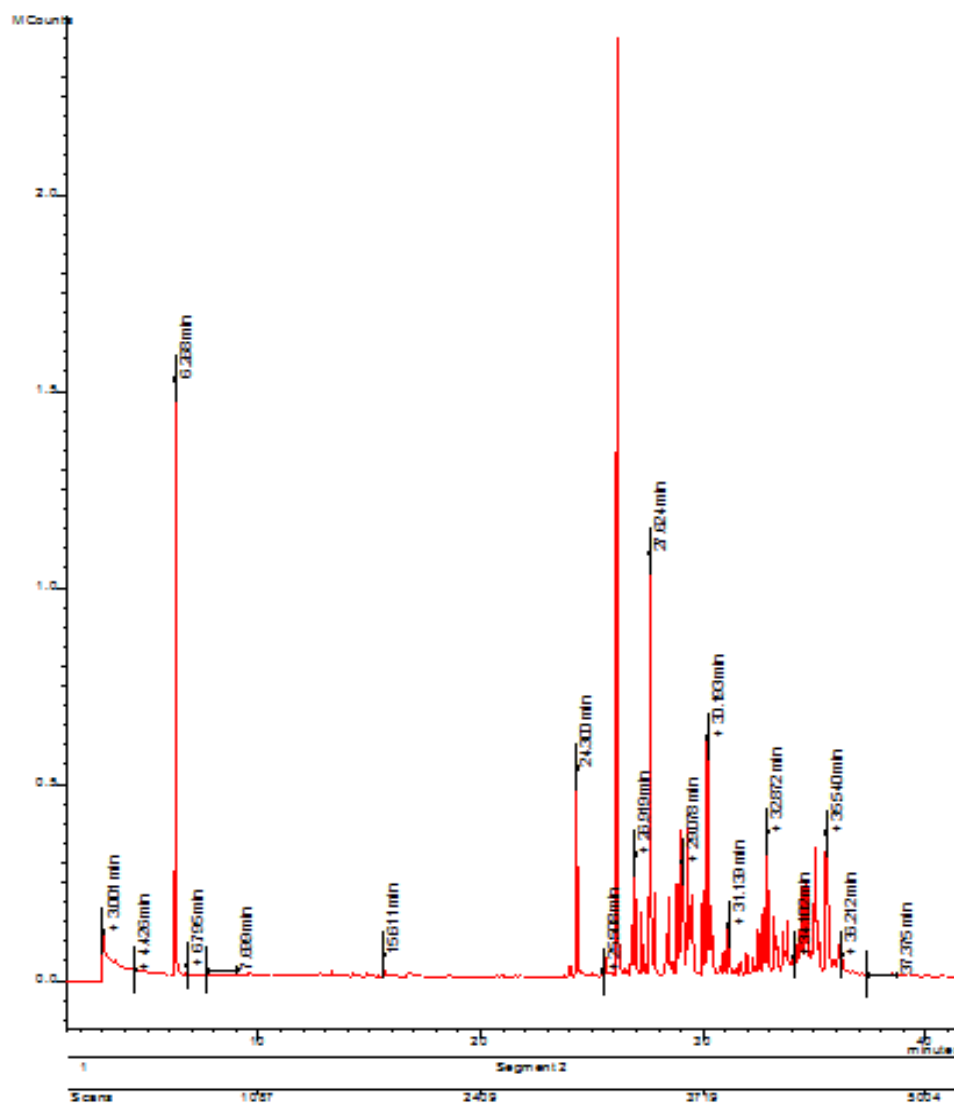
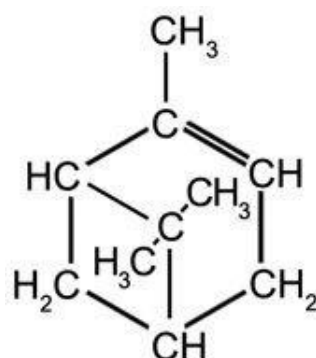


Figura 02 - Cromatograma (CG/EM) obtido pela análise da amostra do óleo essencial de *A. saturioides*,

Tabela 1: Compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *A. satureioides*

Componente do óleo	IK	IK ^a	%
2-Heptanona	890	889	1,284
Alfa-cadineno	1517	1524	1,502
Alfa-copaeno	1374	1376	2,058
Alfa-humuleno	1454	1454	2,171
Alfa-pineno	932	939	45,49
Avetato isopentil	892	876	5,72
Beta- selineno	1488	1485	1,298
Componente não identificado	916	916	20,5
Longifoleno	1418	1402	4,126
Total %			84,149

IK, Índice de Kovats Experimental; Ik^a Retirado de Adams.

**Figura 03** - Estrutura química do alfa-pineno (<http://spanish.alibaba.com>).

O rendimento de obtenção do óleo de *A. satureioides* por hidrodestilação pôde ser considerado baixo, uma vez que a partir de 3 kg de inflorescências da planta apenas 900 µL de óleo foram obtidos sob nossas condições experimentais. A variação deste rendimento pode ser grande, inclusive para outras plantas produtoras de óleo, a considerar a capacidade de produção de óleo pela planta, a época do ano em que a coleta fora feita, as condições de clima e solo de onde a planta fora cultivada e ainda quanto ao procedimento de obtenção do óleo (CEZAROTTO *et al.*, 2011) (INIA, 2004). Para o caso de *A. satureioides* e, segundo informações populares da cultura gaúcha, sabe-se que sua produção de aroma e, então de óleo, parecem ser máximas entre

os meses de março e abril de cada ano (época da Sexta-Feira Santa), onde segundo também as tradições folclóricas o poder terapêutico da planta parece ser potenciado. A coleta e obtenção de nosso óleo aconteceram em data similar, porém no estado de São Paulo. Apesar destas informações e do baixo rendimento na obtenção do óleo em nossas condições experimentais, a quantidade obtida foi suficiente para a realização de todo o quadro experimental proposto para investigação das propriedades ansiolíticas da planta através de diferentes bioensaios. Neste contexto, foi utilizada uma mesma partida de óleo para todos os experimentos interpretados em conjunto, em que sua constituição química era completamente conhecida e igual para todos os testes (Tabela 1). Isto evita o uso de diferentes partidas de óleo em que as composições pudessem ser diferentes para diferentes experimentos complementares, dificultando, no caso, a definição de associação entre a presença ou ausência de compostos químicos e a presença ou ausência de atividade farmacológica, ou mesmo variação desta última.

Os resultados da análise fitoquímica apresentados na Tabela 01 estão de acordo com as considerações de Bakkali, *et al.*, (2008), que descreve os óleos essenciais como sendo misturas naturais muito complexas, que podem conter cerca de 20-60 componentes em diferentes concentrações. Eles são caracterizados por dois ou três grandes componentes, em concentrações bastante elevadas (20-70 %). Também e como dito anteriormente, o alfa-pineno como sendo o composto majoritário do óleo essencial de *A. satureioides* parece ser comum, o que concilia nossos dados com aqueles, por exemplo, obtidos por (LAMATY, *et al.*, 1991; BAUER, *et al.*, 1992; LORENZO, *et al.*, 2000 e CEZAROTTO, *et al.*, 2011), mostrando, pois, que o óleo varia relativamente pouco em relação a sua constituição predileta para altas concentrações em termos do alfa-pineno.

Para o estudo de óleos essenciais e extratos de plantas é comum o associar de suas atividades farmacológicas com a presença do composto majoritário. Entretanto, parcimônia é necessária para quando desta assertiva, uma vez que o composto majoritário pode não ser o único responsável pelos efeitos farmacológicos a serem observados. Isto é possível uma vez que diferentes compostos podem tomar parte desta ação por sinergia ou mesmo atuarem de modo isolado mesmo que em concentrações muito pequenas, o que também não é incomum em se tratando de óleos essenciais e fitocomplexos (LOBATO, *et al.*, 1989; BAKKALI *et al.*, 2008; RATTAN R.S; 2010).

Apesar da ressalva, a alta concentração de alfa-pineno encontrada no óleo de *A. satureioides* (45,49%) nos chamou a atenção e nos levou a crer que o mesmo pudesse

estar ligado às ações farmacológicas do óleo, caso estas fossem comprovadas. De fato e uma evidência importante em favor do alfa-pineno para quando de uma provável atividade ansiolítica é que o mesmo se trata de um terpeno, classe de moléculas prodigas em ter ação no SNC de mamíferos. De fato, muitos terpenos são conhecidos por terem ações ligadas a modulação de receptores GABAérgicos ou por inibição da enzima colinestrase (RATTAN, 2010). Esses dados também estão de acordo com Satou, *et al.*, (2010) que estudaram a farmacocinética de distribuição tecidual dos componentes alfa-pineno, p-cimeno, 1,8-cineol, e limoneno no óleo essencial *Alpinia zerumbet* e demonstraram a atividade ansiolítica do óleo nos testes de Campo Aberto e LCE após a inalação do mesmo. Os autores demonstraram o acúmulo do alfa-pineno marcado no cérebro e no fígado dos animais, demonstrando sua capacidade de atingir a corrente sanguínea e de ultrapassar a barreira hemato-encefálica mesmo que por via inalatória. O fato de um determinado composto ser capaz de ultrapassar a barreira hemato-encefálica é de importância farmacocinética salutar no desenvolvimento de novas drogas de interesse farmacêutico e nas escolhas das vias de administração (GOLAN, ARMEN, *et al.*, 2009). Ao mesmo tempo em que estes dados obtidos pelos autores citados validam a ação ansiolítica do alfa-pineno e sua capacidade de agir no SNC mesmo que usado na forma de aromaterapia, forma esta importante no uso de *A. satureioides* quando da medicina popular até então.

As considerações das possibilidades de relação entre o composto majoritário (alfa-pineno) e a atividade farmacológica a ser comprovada ou descartada (ansiolítica), tão bem como a sua capacidade já conhecida de atravessar a barreira hematoencefálica, foram fatores importantes na escolha da via de administração do óleo de *A. satureioides* para os nossos protocolos experimentais, ou seja, a via i.c.v usando de estereotaxia. A escolha desta via ainda nos permitiu economia de óleo, obtido em baixas quantidades, a opção por uma via de absorção de droga menos errática que a inalatória, e o oferecimento de altas doses de ativos no tecido alvo final (SNC). A escolha do ventrículo lateral direito é óbvia, uma vez que a partir do mesmo várias áreas cerebrais podem ser atingidas. Esta escolha é comum ao iniciarmos trabalhos com um novo ativo para investigação de ação no SNC, visto que em casos de comprovação de atividade, áreas cerebrais específicas podem mais tarde serem estudadas em isolado ou combinado para verificação de participação da mesma(s) na ação farmacológica da droga em teste. Finalmente e também para os nossos testes envolvendo o óleo, as doses (0,5, 1 ou 2 μ L) em escala geométrica foram escolhidas com base nos limites usuais de aplicação de

drogas via i.c.v., ou seja entre 0 e 3 μL . O limite máximo de 3 μL é ditado pelo volume apresentado pelo ventrículo lateral de pequenos roedores, em nosso caso ratos.

A seguir são mostrados os resultados dos testes (Figuras 4-7) para análise de diferentes parâmetros comportamentais ligados á ansiedade nos modelos: LCE, Campo Aberto, Transição Claro-Escuro e Rotarod de diferentes grupos animais controles e experimentais, usando de cirurgia estereotáxica e, pois, administração i.c.v de diferentes doses do óleo.

No teste do LCE o aumento do tempo gasto, bem como o número de visitas aos braços abertos fornecem respectivamente uma medição da inibição do medo e da atividade exploratória (JONES, *et al.*, 1992). Em nosso teste do LCE foram analisados quatro parâmetros comportamentais, todos ligados à ansiedade: (1) número de entradas e (2) tempo de permanência nos braços abertos, que indicam padrões de atividade ansiolítica da droga em teste. Assim, quanto maior o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, menor o grau de ansiedade dos animais. Os outros dois parâmetros são (3) número de entradas e (4) tempo de permanência nos braços fechados, que indicam padrões de atividade ansiogênica, ou seja, quanto maior o número de entradas e o tempo de permanência nos braços fechados, maior o grau de ansiedade dos animais.

Os ensaios *in vivo* para análise dos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos de diferentes volumes de óleo essencial (0,5; 1 e 2 μL) no teste do LCE em comparação com grupos controles são mostrados na Figura 4.

No teste do LCE, não foi verificada ação ansiolítica significativa para nenhum dos diferentes volumes do óleo essencial administrados (Figura 4A – 4D). Ou seja, não houve aumento do tempo de permanência nos braços abertos e nem aumento do número de entradas nos braços abertos por parte dos animais experimentais em relação ao controle salina, fato este verificado significativamente para o grupo diazepam, ao menos em nível do aumento no tempo de permanência nos braços abertos (Figura 4A). Por outro lado, também não foi verificada ação ansiogênica para os diferentes volumes de óleo avaliados; nota-se que o número de entradas, bem como o tempo de permanência dos animais nos braços fechados não apresentam diferenças estatísticas quando comparados com os dados do grupo de animais controle em que foi administrado salina (Figura 4B e 4D). De outro modo, o tempo de permanência no braço fechado e o número de entradas nos braços fechados dos animais tratados com o diazepam

diminuíram em relação ao grupo salina, no que se pode entender ausência de efeito ansiogênico e presença de efeito ansiolítico (Figura 4B e 4D).

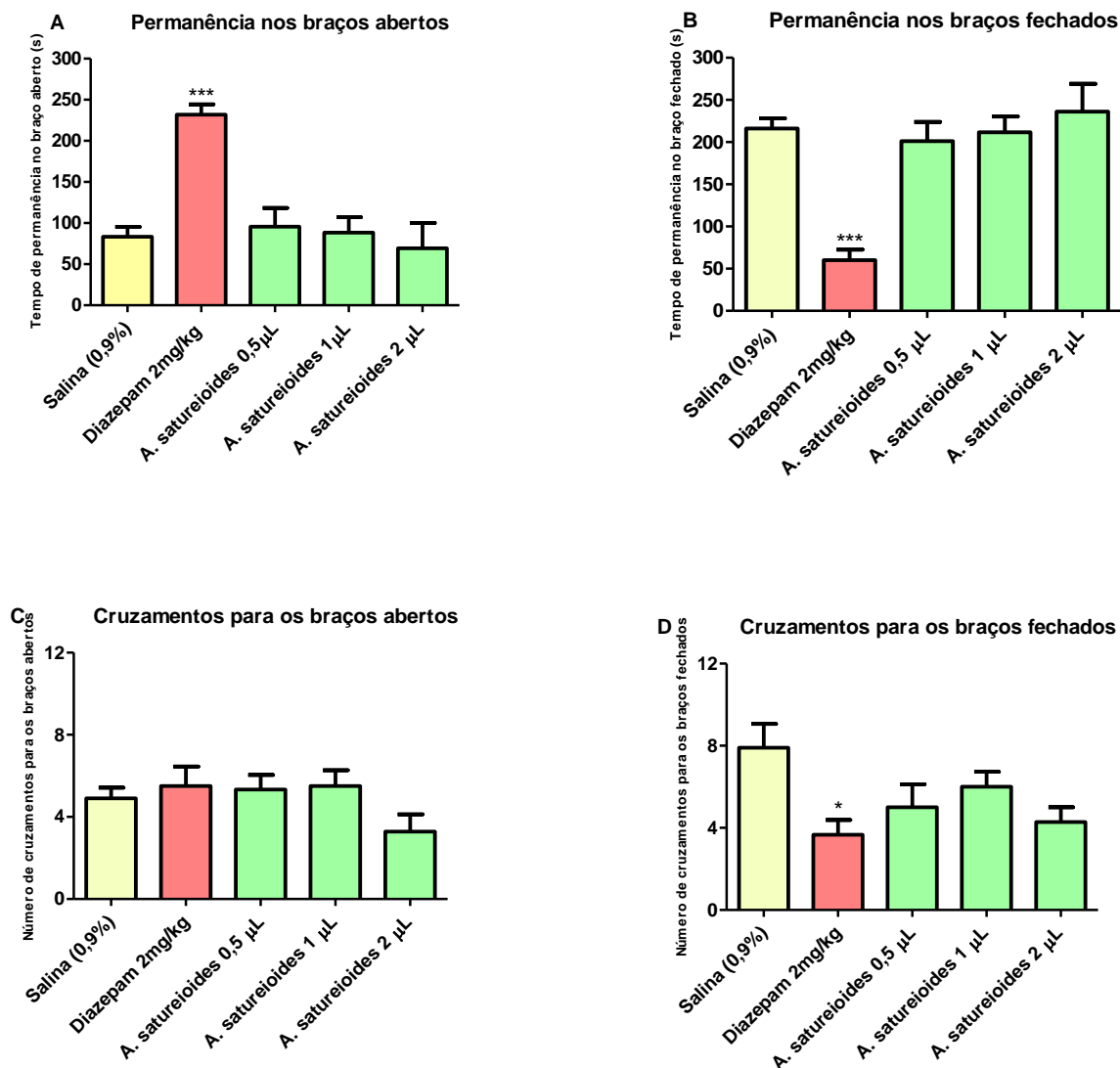


FIGURA 4 - Avaliação dos efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos do óleo essencial de *A. saturoioides* (0,5, 1 e 2 µL; icv) no teste LCE. A) Tempo de permanência nos braços abertos; B) Tempo de permanência nos braços fechados; C) Número de cruzamentos para os braços abertos; D) Número de cruzamentos para os braços fechados. Os dados foram analisados com ANOVA one-way seguido de pós-teste Tukey. (* para $p < 0,05$; *** para $p < 0,001$).

A Figura 5 (A e B) mostra os resultados do Teste da Caixa Claro-Escuro. Nesse teste foram avaliados dois parâmetros comportamentais: (1) o tempo de permanência no lado iluminado da caixa (claro) e (2) número de entradas do lado iluminado (claro). Sendo que, quanto maior o número de entradas e o tempo de permanência no lado

iluminado, menor o nível de ansiedade dos animais (logo, efeito ansiolítico do tratamento).

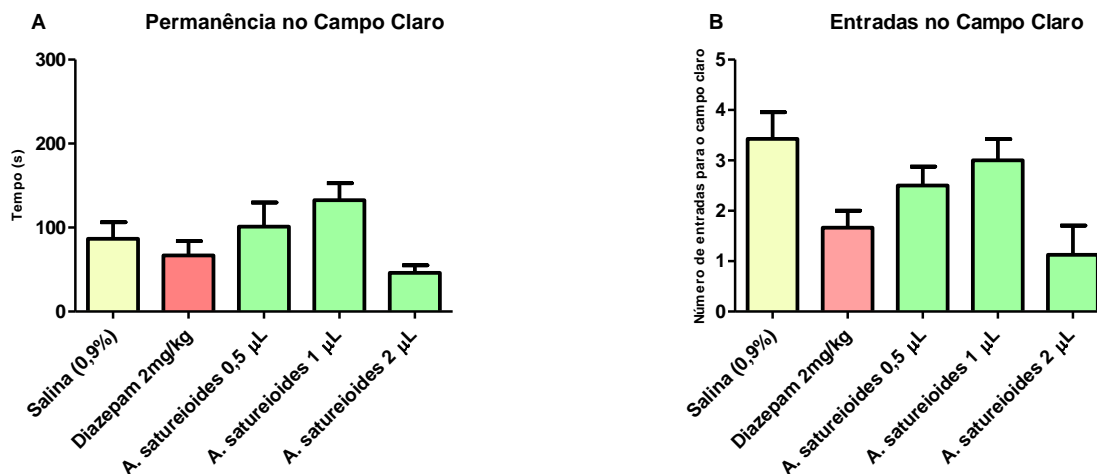


FIGURA 5 - Avaliação dos efeitos ansiolíticos do óleo essencial de *A. saturoioides* (0,5, 1 e 2 µL; icv) em teste de ansiedade na caixa claro/escuro. A) Tempo de permanência no campo claro; B) Número de entradas no campo claro. Os dados foram analisados com ANOVA one-way seguido de teste Tukey. ($P < 0,05$).

Neste teste, novamente não foram observadas atividades ansiolíticas para nenhuma das doses testadas do óleo essencial de *A. saturoioides*, nem para quando da avaliação do tempo de permanência no campo claro, nem para quando do número de entradas neste último campo (5A e 5B, respectivamente). Diferenças significativas também não foram notadas para o grupo diazepam, o que costuma ser comum neste tipo de teste (Figuras 5 A e B) (Rosa et al., 2011).

Os ensaios para avaliação de efeitos ansiolíticos de diferentes volumes de óleo essencial também foram feitos no teste do **Campo Aberto** e os resultados são mostrados na Figura 6. Nesse teste foram analisados três parâmetros comportamentais: (1) a exploração horizontal (número de linhas cruzadas), para verificar se houve perda da capacidade motora ou sedação do animal (quanto maior o número de linhas cruzadas, maior é a atividade motora e menor a sedação); (2) a exploração vertical (“*rearing*”) e (3) o comportamento de limpeza (“*grooming*”), foram utilizados para verificação da atividade ansiolítica, sendo que quanto maior a exploração vertical e autolimpeza, menor o grau de ansiedade do animal.

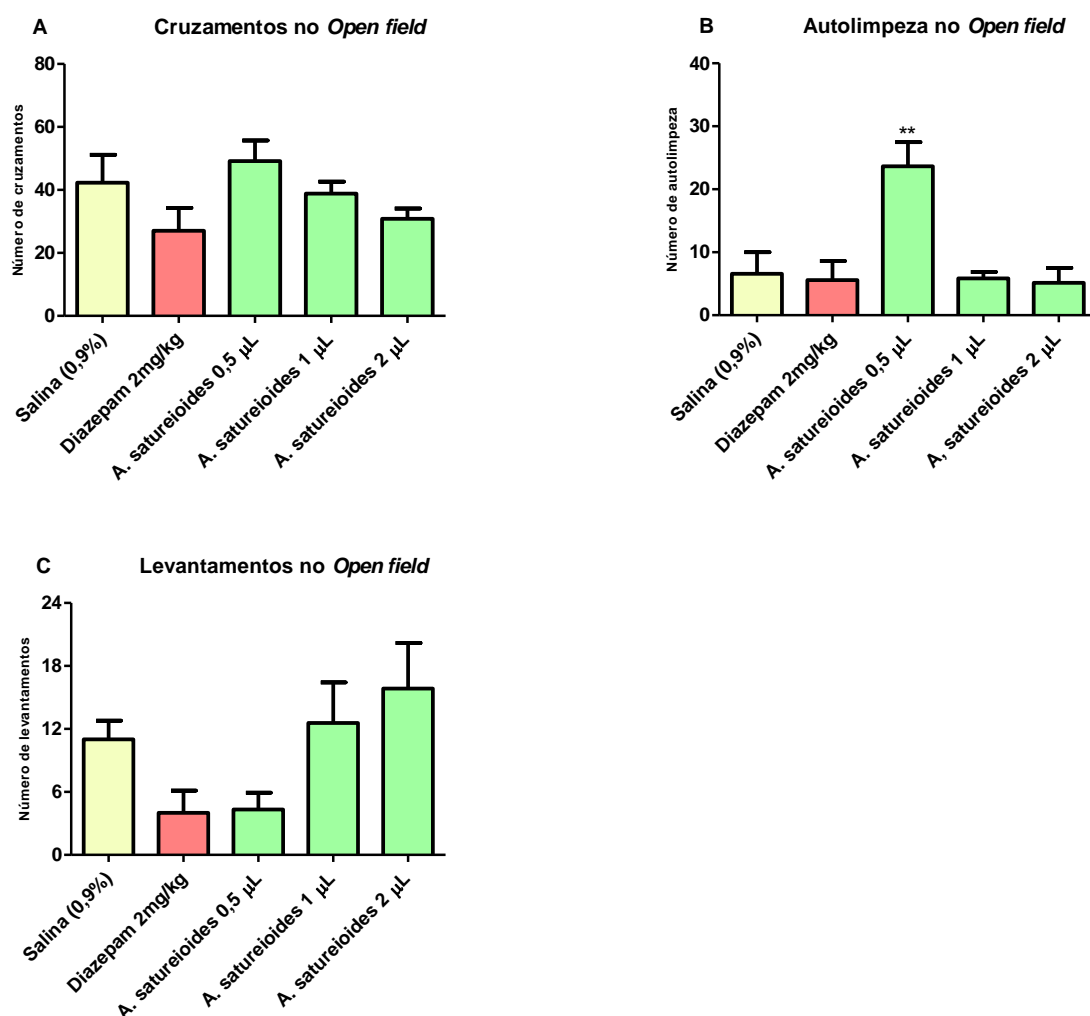


FIGURA 6 - Avaliação dos efeitos ansiolíticos do óleo essencial de *A. saturoioides* (0,5, 1 e 2 µL; icv) em teste ansiolítico e motor *Open Field*. A) Número de cruzamentos; B) Frequência de autolimpeza; C) Frequência de levantamento (elevação nas patas anteriores). Os dados foram analisados com ANOVA one-way seguido de teste Tukey. (** p<0,01).

Nota-se neste teste do **Campo Aberto (Open Field)** que o número de cruzamentos de linhas horizontais pelos diferentes grupos tratados com o óleo essencial foi igual ao grupo controle salina, indicando manutenção da capacidade motora e ainda ausência de sedação ou aumento do estado de alerta dos animais (Figura 6A). Em concordância com os resultados apresentados nos testes de LCE e da caixa Claro-Escuro, o teste do Campo Aberto também não demonstrou efeito ansiolítico para as diferentes doses do óleo essencial de *A. saturoioides*. Isto pode ser notado pelo fato de ter não havido alterações no número de autolimpezas (Figura 6B) e levantamentos

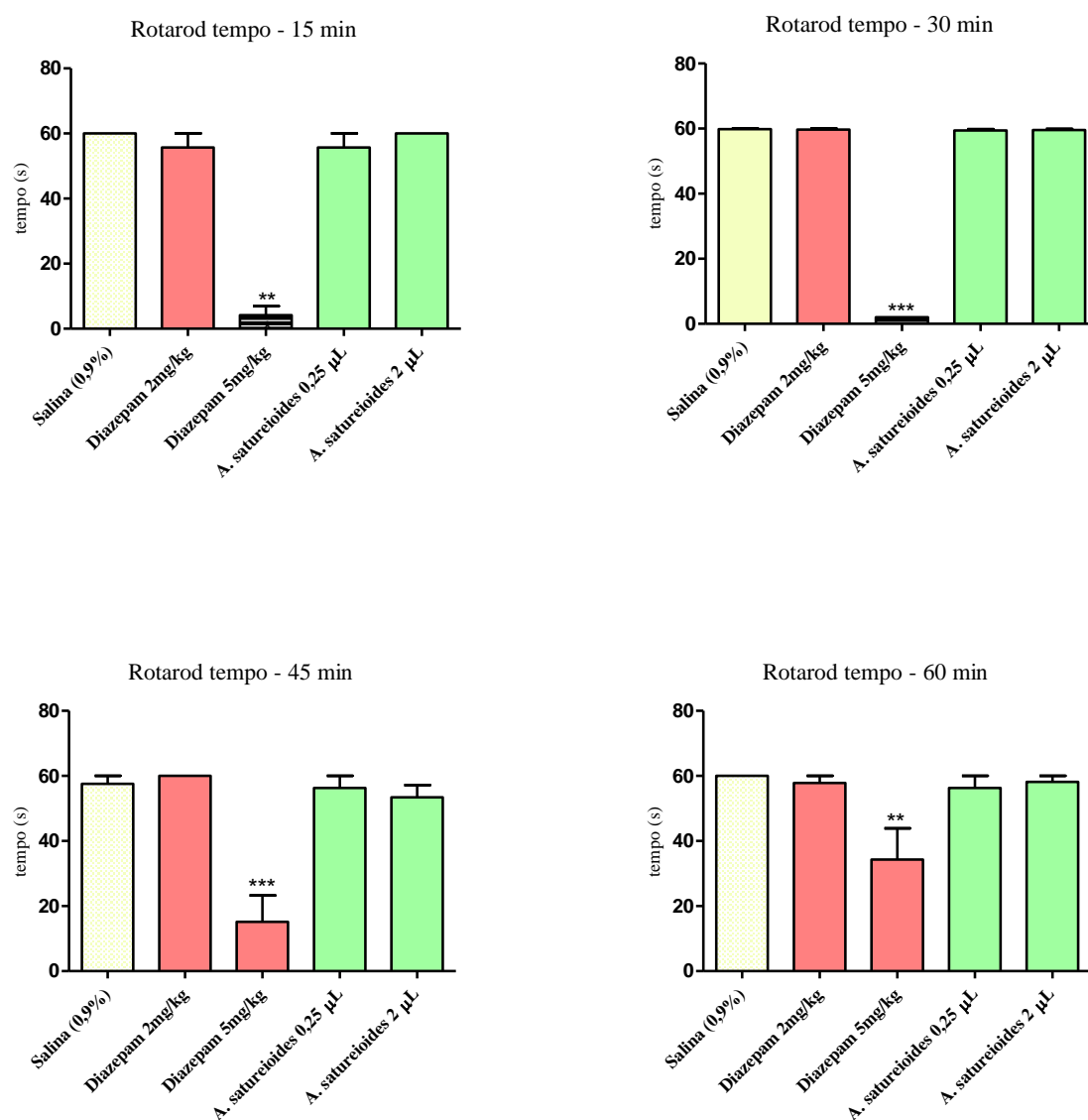
(Figura 6C) no teste do campo aberto para todas as diferentes doses do óleo ensaiadas. A exceção ficou por conta da dose de 0,5 μ L do óleo quando do aumento do número de autolimpezas (Figura 6C). Entretanto, este dado isoladamente é insuficiente para o apontar de uma atividade ansiolítica satisfatória.

Levando-se em conta esses resultados e nossas condições experimentais estritamente, podemos afirmar que não foi comprovada ação ansiolítica para as diferentes doses do óleo essencial de *A. saturoioides* quando aplicado via i.c.v, donde se atinge em altas concentrações o tecido alvo final (SNC) e suas diferentes regiões a partir do ventrículo lateral direito. Outras concentrações do óleo foram testadas nos diferentes testes aqui aplicados. Muito embora doses menores do que 0,5 μ L (mais precisamente 0,25 μ L) tenham mostrado alguma tendência discreta de atividade ansiolítica quando da avaliação de alguns dos parâmetros de ansiedade (aumento de permanência no campo claro no Teste da caixa claro/escuro e aumento de autolimpeza no Teste do Campo Aberto), estes dados foram considerados insuficientes para o apontar de uma atividade ansiolítica satisfatória, sendo no contexto geral considerados de fato inconclusivos (dados não apresentados). Assim, experimentos envolvendo novas doses de óleo e o uso da via inalatória podem ser importantes para uma comprovação definitiva das conclusões deste trabalho.

A partir deste trabalho e ao contrário do histórico de aplicação etnofarmacológica da planta, pode-se dizer que o conjunto de dados de experimentos clássicos de ansiedade parece não comprovar a atividade ansiolítica proclamada popularmente para planta. Apesar de neste trabalho ter sido utilizada uma via (i.c.v) diferente daquela usada pela população (inalatória), há que se considerar as vantagens do uso da via i.c.v. acima discutidas (opção por uma via de absorção de droga menos errática que a inalatória e o oferecimento de altas doses de ativos no tecido alvo final). Assim, se a ação ansiolítica não fora comprovada utilizando-se altas concentrações de ativos no tecido alvo final (SNC), é pouco provável que o uso de aromaterapia leve a resultados diferentes destes obtidos, muito embora novos experimentos sejam necessários para o comprovar definitivo deste mister.

Ainda visando confirmar o possível efeito do óleo no impedimento locomotor e sedação dos animais, o teste do Rotarod foi aplicado em adição ao teste do Campo Aberto. O teste do Rotarod foi descrito inicialmente por Dunham e Miya, (1957) e é amplamente utilizado na detecção de impedimento motor, causado por agentes farmacológicos tais como, relaxantes musculares esqueléticos ou depressores do sistema

nervoso central e também na avaliação do comprometimento neurológico, incluindo ataxia, sedação ou relaxamento muscular (RODGERS *et al.*, 1997). Nesse teste quanto maior o tempo de permanência do animal no aparelho melhor seu desempenho locomotor e mais baixo é seu nível de sedação. Os resultados deste teste são apresentados na Figura 7.



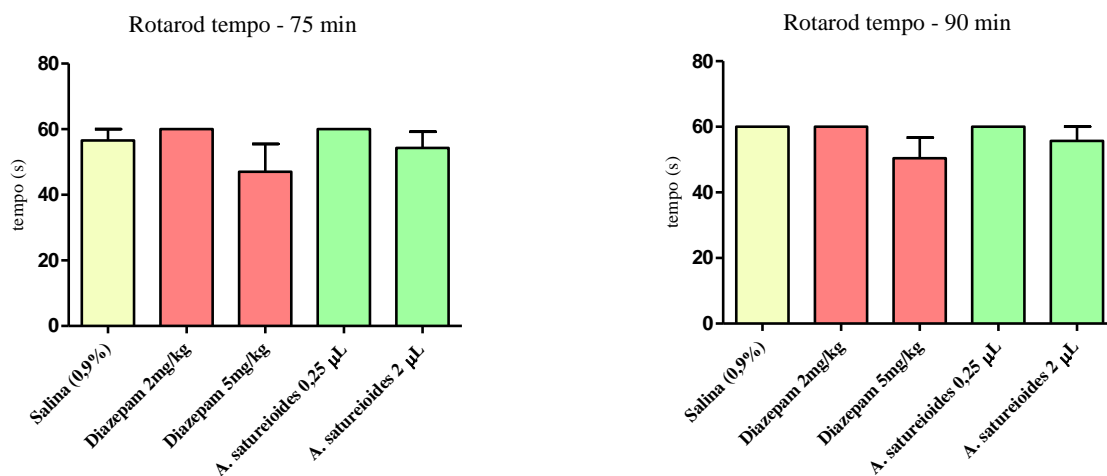


FIGURA 7 - Avaliação dos efeitos do óleo essencial de *A. saturoioides* (0,25 e 2 µL; icv) sobre a coordenação motora e estado de vigília dos animais (RotaRod). A) tempo 15 minutos; B) tempo 30 minutos; C) tempo 45 minutos, D) tempo 60 minutos, E) tempo 75 minutos e F) tempo 90 minutos. Os dados foram analisados com ANOVA one-way seguido de teste Tukey. ($P < 0,05$).

Os resultados demonstram que o diazepam na dose de 2 mg/kg e o óleo essencial de *A. Saturoioides* nos volumes de 0,25 e 2 µL (respectivamente, o menor e o maior volume utilizados nos testes anteriores) apresentam padrões de resposta semelhantes ao controle negativo (salina), o que significa que o óleo nos volumes testados e o diazepam (2 mg/kg) não interferem na coordenação motora ou no estado de alerta dos animais (sedação) dos animais, ao menos nas doses ensaiadas (Figura 7 A, B, C, D, E e F). Estes resultados concordam com aqueles obtidos no teste de Campo Aberto no que tange a exploração horizontal (cruzamento de linhas) (Figura 6A).

Contrastando com todos os demais grupos testados, o grupo tratado com diazepam 5 mg/kg demonstrou severa perda da capacidade locomotora e/ou sedação nos primeiros 60 minutos de observação, o que é notado pelo baixo tempo de permanência dos animais na barra de rolagem do aparelho, quando comparado com o grupo salina (Figuras 7 A, B, C, D), evidenciando, pois, a funcionalidade do experimento do RotaRod. Isto também vai de encontro a literatura científica que mostra ser o diazepam ansiolítico na dose de 2mg/Kg e sedativo na dose de 5 mg/kg, ambas i.p., em condições experimentais semelhantes (PRUT e CATHERINE, 2003).

Nota-se assim, que o aumento de dose do diazepam para pouco mais de duas vezes (2 para 5 mg/Kg) gera grande perda da capacidade locomotora e/ou sedação nos animais, algo que de maneira equiparada não acontece quando aumentamos o volume

de óleo administrado, mesmo que por oito vezes (0,25 para 2 μ L; i.c.v.). Essa diferença quanto a capacidade motora e/ou sedação dos animais testados com o óleo e dos animais testados com diazepam, pode apontar mesmo que preliminarmente, que o óleo de *A. satureioides* possa, diferentemente dos benzodiazepínicos, não interferir ou modular a neurotransmissão GABAérgica. Além disso, padrões de resposta diferentes entre diferentes doses do óleo e o diazepam também foram observados em outros testes aqui apresentados. Entretanto, apenas estas diferenças não são suficientes para comprovação definitiva de ausência de ação do óleo sobre os receptores benzodiazepínicos.

Os dados em conjunto dos ensaios do Campo Aberto e do teste de RotaRod parecem apontar que o óleo essencial de *A. satureioides*, ao menos nas doses ensaiadas, além de não apresentar atividade ansiolítica parece também não apresentar atividade sedativa. Apesar da forte indicação em contrário ao uso popular também para ação sedativa, existe a necessidade de novos estudos que sejam ainda mais específicos para sedação, como quando através do uso do teste do Pentobarbital (TORTORIELLO & LOZOYA, 1992); (AGUIRRE-HERNANDEZ ET AL., 2007). O potencial efeito sedativo é também bastante explorado popularmente para quando do uso da planta por aromaterapia.

Assim, com o desdobramento deste trabalho, envolvendo mais estudos específicos para sedação, e talvez o uso de doses menores e uso da via inalatória para o descarte definitivo da atividade ansiolítica e também a sedativa, é provável que necessitemos pôr sob vigilância técnica o uso popular do óleo *A. satureioides* como um depressor genérico do SNC (aromaterapia), até então creditado popularmente por promover diminuição da ansiedade e tranquilizar o sono. Isto mostra, pois, a importante contribuição deste trabalho, sobretudo acerca de seu papel epidemiológico-sanitário.

Os trabalhos de etnofarmacologia fortalecem cada vez mais a ideia que as plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Assim sendo, elas representam uma fonte promissora de moléculas potencialmente úteis ao homem, onde destacamos o óleo essencial pela sua grande diversidade de metabólitos secundários. Nesse sentido, estudos de etnofarmacologia que validem ou invalidem as informações populares sobre o uso medicinal de algumas plantas são de enorme importância, sobretudo se associados a uma robusta investigação fitoquímica. De fato, quando analisamos a contribuição das plantas no desenvolvimento de fármacos pode se observar que nos últimos 25 anos, aproximadamente, metade de todas as drogas

licenciadas eram produtos naturais ou deles derivadas. No entanto, dos 84 psicotrópicos registrados nesse período, apenas três foram derivados de produtos naturais (NEWMAN E CRAGG; 2007), o que mostra a carência de novos estudos se tomarmos por base a efetividade na descoberta de outros tipos de drogas, mesmo que considerando a dificuldade operacional e adicional no desenvolvimento de drogas com ação no SNC.

Assim e quanto à medicina popular, várias espécies vegetais têm sido utilizadas, sendo que algumas possuem estudos bem definidos sobre seus compostos químicos e farmacologia, porém a maioria dessas espécies é utilizada apenas tendo por base o conhecimento empírico e popular, o que não é suficiente para validar plenamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (SIMÕES, 1988; ABBOUT, 1988). Como bem sabido o uso indiscriminado de plantas medicinais e sem respaldo científico pode trazer perigo a população, como no agravar de quadros clínicos devido a ineficácia do tratamento, associações medicamentosas indevidas, efeitos colaterais severos e quadros de intoxicação, o que mostra mais uma vez a importância dos estudos de ordem etnofarmacológica, seja para comprovação de eficácia ou ineficácia (HEINRICH, 2003; SILVA, *et al.*, 2008).

Tendo em mente que o Brasil possui de 15 a 20% da biodiversidade global (LEITÃO, FONSECA-KRUEL, *et al.*, 2009), o Ministério da Saúde brasileiro desenvolveu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, instituído em 2008 pela portaria nº 2.960. Nele há uma Relação de plantas de interesse do Plano Nacional de Plantas Medicinais, que tem como um dos seus objetivos, inserir de maneira segura e eficaz o uso de plantas medicinais no Sistema Único de Saúde (SUS), assim como estimular e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros, como países como a China há muito tempo o fazem e valorizam (RENISUS, 2009).

Dentro de nosso contexto de pesquisa e a fim de evidenciar o potencial das plantas medicinais em tratamentos da saúde humana e mais especificamente no tratamento da ansiedade, podemos citar um estudo promissor, onde pacientes submetidos à aromaterapia com o óleo essencial de *Lavandula hybrida* tiveram uma significativa redução da ansiedade, com baixo custo e risco (BRADEN, REICHOW e HALM, 2009). Nesse sentido, novos esforços se dão na tentativa de buscar uma forma de tratamento opcional e/ou sucedâneo e/ou complementar aos benzodiazepínicos. Apesar de nos últimos 45 anos terem sido as drogas mais comumente utilizadas no controle da ansiedade (Rabbani, *et al.*, 2003) e apresentarem benefícios bem descritos e

caracterizados, os benzodiazepínicos apresentam também vários inconvenientes e efeitos colaterais (HEINRICH, 2003; SILVA, *et al.*, 2008), como sedação, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e dependência física, entre outros (KAPLAN & SADOCK, 2005). Devido sobretudo a esses efeitos colaterais, cerca de 43% dos pacientes que apresentam transtornos da ansiedade, usam alguma forma alternativa de terapia, particularmente fitoterápicos (ERNST, 2006), o que se mostra como um nicho farmacêutico e epidemiológico bem interessante. Assim a fitoterapia, também no formato de aromaterapia, vem demonstrando crescente interesse, como uma terapia alternativa (LEHRNER J, 2005).

Apesar da indiscutível a valia e importância da medicina popular e fitoterapia no contexto, sobretudo de países em desenvolvimento e biodiversos, é importante considerar este uso sob respaldo de uma validação científica rigorosa, principalmente acerca dos potenciais efeitos tóxicos e eficácia. De fato e como dito anteriormente, muitas plantas vêm sendo usadas secularmente na prática caseira ou mesmo comercializadas para fins medicinais sem que nenhuma validação científica de eficácia tenha tomado corpo ao menos em modelos animais ou até mesmo através de experimentos *in vitro*. Este era o caso da *A. saturoioides* para a qual e apesar do uso irrestrito e amplamente disseminado no território nacional, nada havia de comprovação positiva ou negativa para seus potenciais efeitos ansiolíticos e/ou sedativos. Para o caso de uma validação negativa de eficácia, como parece ser o caso deste trabalho, temos em questão um panorama de importante desembocadura epidemiológico-sanitária. Com efeito, isso impede que pacientes sejam expostos desnecessariamente aos potenciais efeitos tóxicos do óleo essencial de *A. saturoioides*, sobretudo no uso crônico. Ao mesmo tempo em que impede que o paciente fique submedicado quando do uso sucedâneo ou complementar da medicina alternativa em relação àquela convencional no combate a ansiedade e distúrbios do sono, sobretudo na forma do uso dos benzodiazepínicos e apesar dos efeitos colaterais conhecidos destes últimos.

Finalmente, é preciso considerar que a enviesada convergência da literatura científica para demonstração apenas dos resultados positivos da etnofarmacologia em detrimento daqueles que efetivamente mostram ineficácia da planta para algumas de suas potenciais propriedades terapêuticas é de fato extremamente perniciosa (ERNST, 2006; KINRYS *et al.*, 2009). Isto atrapalha e atrasa o progresso de um conhecimento valioso ao mesmo tempo em que existe a necessidade de vigilância epidemiológico-

sanitária contínua e ou tão mais rigorosa para a medicina alternativa quanto aquela que se acredita existir para medicina convencional.

Os problemas técnicos acima citados não diminuem a potencialidade dos produtos naturais quando para uso medicinal, mas colocam em evidência um problema de saúde pública a ser considerado com cuidado, sobretudo, quando no momento em que a população necessita de alternativas terapêuticas que sejam seguras, mas também realmente eficazes quando usadas de forma sucedânea ou complementar ao uso de medicamentos convencionais, incluindo os ansiolíticos e/ou sedativos.

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir do presente trabalho que:

- O óleo essencial de *A. satureioides*, aqui obtido por hidrodestilação simples, é obtido em baixo rendimento e apresenta-se majoritariamente constituído do terpeno alfa-pineno (45,49%), o que está de acordo com a literatura corrente, demonstrando que o óleo parece relativamente pouco variar em termos desta constituição. A análise feita neste trabalho por CG/EM serve de marcação fitoquímica para reprodução futura dos resultados aqui obtidos e ainda para correlação entre constituição química e desempenho farmacológico;
- Através do uso de testes comportamentais clássicos (LCE, Teste da Caixa Claro/Escuro e Teste do Campo aberto) para validação de ativos ansiolíticos foi descartada a ação ansiolítica para o óleo de *A. satureioides*, ao menos pela via i.c.v e nas doses utilizadas. Considerando que a via escolhida neste trabalho é menos errática e que propicia grandes quantidades de ativos no tecido alvo final (SNC) e suas diferentes regiões a partir do ventrículo lateral direito, é pouco provável que resultados diferentes sejam obtidos quando do uso da via inalatória, embora experimentos sejam necessários para comprovação final desta conclusão;
- Ainda que parcialmente e através da análise conjunta entre os dados obtidos pelo teste do Campo aberto e Rotarod é possível afirmar que o óleo, ao menos nas doses ensaiadas e via i.c.v, também parece falhar em demonstrar atividade sedativa significativa, outra propriedade clamada na medicina popular quando do uso do óleo por aromaterapia. Entretanto, a confirmação decisória sobre este fato carece de experimentos mais específicos para o estudo de sedação. Adicionalmente, o óleo também não afeta a

coordenação motora, o que preliminarmente, mostra que o mesmo parecer ser bem tolerado pelos animais, ao menos no que tange a importante efeito negativo quando do uso de ativos para prováveis atividades ansiolíticas e sedativas, aqui claro, descartadas;

- Estes dados parecem, pois, por ao menos em dúvida o uso popular da *A. saturiódes* por aromaterapia, onde são clamadas propriedades que diminuem a ansiedade e tranquilizam o sono. Este achado é importante, pois, este uso é bastante comum no Brasil, especialmente na região sul, onde existe até a exploração comercial da planta para este fim através do uso de travesseiros artesanais ou semi-industriais;

- Os dados aqui apresentados são de enorme importância no que tange ao panorama epidemiológico-sanitário, pois, apesar de o uso de plantas na medicina popular e fitoterapia ser de marcada valia, é importante ponderar que a comprovação de ineficácia terapêutica de uma dada planta é tão importante quanto a validação positiva deste mister. Isto é dado, pois, impede que pacientes sejam expostos desnecessariamente aos efeitos tóxicos da planta, sobretudo no uso crônico, quanto impede que o paciente fique submedicado quando do uso sucedâneo ou complementar da medicina alternativa em relação àquela convencional, independentemente da terapia que estamos a considerar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUT, P. I. Comfrey: assessing the low-dose health risk. **The Medical Journal of Austrália**, v. 149, 1988.

ADAMS, R. P Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. **Allured Publishing Corp.**, Carol Stream, Illinois, p. 469, 1995.

AGUIRRE H, ROSAS A, SOTO H M, MARTÍNEZ A, MORENO J, GONZÁLEZ T E. Bioactivity-guided isolation of beta-sitosterol and some fatty acids as active compounds in the anxiolytic and sedative effects of *Tilia americana* var. *mexicana*. **Planta Med** v.73, p. 1148-1155, 2007a.

ALONSO JR. Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas. **ISIS Ediciones SRL**, p.238-254, 1998.

ANDREATINI R, BOERNGEN-LACERDA R, ZORZETTO FILHO D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Ver. Bras. Psiquiatr.** v.23, n.4, p.233-42, 2001.

ATSUMI T, TONOSAKI K. Smelling lavender and rosemary increases free radical scavenging activity and decreases cortisol level in saliva. **Psychiatry**; v.150, n. 1, p. 89–96, 2007.

BAGETTA , G. et al. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**, v. 81 , p. 453–461, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n.2, p. 446–475, 2008.

BARLOW, D.H. - **Anxiety and its disorders: the nature and treatment of anxiety and panic**. 2^a ed. New York: The Guilford Press, 2002.

BAUER, I. et al. *Achyrocline satureioides* chemotypes. In: **I. World Congress on Medicinal and Aromatic Plants for Human Welfare**, Maastricht, Holanda, 1992.

BECHELLI, L. P. D. C.; NARDI, A. E. Tratamento Farmacológico da Ansiedade. **J. Bras. Psiquiatr**, v. 37, n. 3, p. 121-126, 1988.

BOTTEGA, F. C. et al. **Influência De Tratamentos Agronômicos Na Produção De Óleos Essenciais Em *Achyrocline Satureioides***. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul. Dourados, MS. 2011.

BOURAS, N.; HOLT, G. Distúrbios psiquiátricos e comportamentais em entectual e Developmental Disabilities. V.2, n.1, **Cambridge Univerity Press**, 2007.

BREMNER, J. D. et al. Elevated CSF corticotropin-releasing factor concentraions in post-traumatic stress disorder. **Am J Psychiatry**, v. 154, p. 624-629, 1997.

BRADEN, ; REICHOW, ; HALM, M. A. The Use of the Essential Oil Lavandin to Reduce. **American Society of PeriAnesthesia Nursing**, v. 24, n. 6, p. 348-355, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. Brasília: **Ministério da Saúde**, p. 92, 2008.

BROOKER, D. et al. Single case evaluation of the effects of aromatherapy and massage on disturbed behaviour in severe dementia. **Br J Clin Psychol** , v. 36, p. 287-296, 1997.

CALANDRE, E. P.; IRIBAS, J. M. Fármacos ansiolíticos e hipnóticos. **Rev. Asoc. Esp. Neuropsiq**, v. 12, n. 1, p. 29-35, 1992.

CALIXTO J.B.. Twentyfive years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J. Ethnofarmacol**, v.100, p. 131-134, 2005.

CARLSON , G.; ROY-BYRNE, P. Tratament of generalized anxiety disorder: do benzodiazepines still have a rol? In nutt D, Rickels K, Stein D, eds *Generalized Anxiety Disorder*. **Martim Dunitz**, London, p. 111-123, 2002.

CEZAROTTO, V.S., GIACOMELLI, S.R., FLORES, E.M.M., MACK, J.M., BARIN, J.S., DA SILVA, U.F., LINARES, C.E.B. Seasonal variation, chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Achyrocline satureoides* (Lam.) D.C. Lat. **American Journal Pharmacology**, v., 30 p., 1536–1541, 2011.

COELHO FILHO, F.M. S. *et al.* Benzodiazepínicos: uso clínico e perspectivas. **Rev Bras Med**, São Paulo, v. 63, n.5,p. 196-200, 2006.

CONNOR, K. M.; DAVIDSON, J. R. Generalized anxiety disorder: neurobiological and pharmacotherapeutic perspectives. **Biol. Psychiatry**, v. 44, n. 2, p. 1226-1294, 1988.

COOKE, B., ERNST, E., 2000. Aromatherapy: a systematic review. **Br. J. Gen. Pract.** v. 50, p. 493–496.

COSTALL, B., JONES, B.J., KELLY, M.E., NAYLOR, R.J., TOMKINS, D.M., Exploration of mice in a black and white box: validation as a model of anxiety. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 32, p.777– 785, 1989.

CRAWLEY, J., GOODWIN, F.K., Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v.13, p.167–170, 1980.

DAVISON, G. C. Abnormal Psychology. **Verônica Visentin**, Toronto, p. 154, ISSN 978-0-470-84072-6, 2008.

DECAUX G, SOUPART, VASSAR. Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: the vaptans. **The Lancet**, v. 9624, p. 1264-1632, 2008.

DIAS, B. F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades.** Campinas. André Tosello, 1996, p. 10.

DUNHAM, N.W., MIYA, T.S., A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n.3, p. 208–209, 1957.

EDGE J. A pilot study addressing the effect of aromatherapy massage on mood, anxiety and relaxation in adult mental health. **Complement Ther Nurs Midwifery**. v. 9, p. 90–97, 2003.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety - a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 205-208, 2006.

ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. Assembléia Legislativa, Gabinete de Consultoria Legislativa. Lei Nº 11.858, de 5 de Dezembro de 2002. Institui a Planta Medicinal Símbolo do Estado. **Constituição Estadual do Estado do Rio Grande do Sul, 2002**, Porto Alegre, RS, 2002.

FERREIRA, A. B. D. O. B. Aurélio século XXI - minidicionário da lingua portuguesa. 4ª. ed. p. 44-46, 2001.

FLAUSINO OA JR, PEREIRA AM, DA SILVA VB, NUNES-DE-SOUZA RL. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n. 2, 2007.

FUNCHS, F. D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional. 4ª. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2012. p. 718-723.

GRAEFF, F. G.; GUMARÃES, S. Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo. **Atheneu**, p. 123-159, 2000

GELFUSO, É. et al. Anxiety: A Systematic Review of Neurobiology, Traditional Pharmaceuticals and Novel Alternatives from Medicinal Plants. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, , v. 12, p. 1-17, 2013.

GOLDBERG, H. Benzodiazepines and nonbenzodiazepines anxiolytics. **Psychopathology**, v. 17, n. 1, p. 45-55, 1984.

GUERRA MP, NODARI, RO.. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (Org.). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 3ª.ed. Porto Alegre-Florianópolis: Ed Universidade, p.13-40, 2001.

GOLAN, D. E. et al. Princípios de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2ª. ed. Rio de Janeiro: Editora **Guanabara Koogan**, 2009.

GUIMARÃES, F. S. **Distúrbios afetivos**. In: **Neurobiologia das doenças mentais**. São Paulo, 3. ed., Lemos editorial, 1996, p.79 -108.

GRUNDMANN, O. et al. Anti-anxiety effects of Apocynum venetum L. in the elevated plus maze test. **J Ethnopharmacol** , v. 110, p. 406-411, outubro 2007.

HEINRICH, M. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures?. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v.3 n.2, p. 41-54, 2003.

HNATYSZYN O. et al. Argentine plant extracts active against polymerase and ribonuclease H activities of HIV-1 reverse transcriptase. **Phytotherapy Research** v. 13, n.3, p. 206-209. 1999.

KAZUO NAKAMURA, MITSUE KURASAWA Antiolytic effects of aniracetam in three different mouse models of anxiety and the underlying mechanism **European Journal of Pharmacology** v. 420, n. 1, 18 May 2001, p. 33-43.

LAURENCE BRUNTON, B. C. . B. K. Goodman e Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12. ed. [S.l.]: **Artmed**, v. 1, p. 320-325, 2012.

LAMATY, G., MENUT, C., BESSIERE, J.M., SCHENKEL, E.P., DOS SANTOS, M.A., BASSANI, V. The chemical composition of some *Achyrocline satureioides* and *Achyrocline alata* oils from Brazil. **Journal of Essential Oil Research**. v.3, p., 317–321. 1991

LAMBERT, M.; NABER, D. S. A. W. T. H. H. H. P. K. A. Rates and predictors of remission and recovery during 3 years in 392 never-treated patients with schizophrenia. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 118, n. 3, August 2008.

LIEBOWITZ, M. R. et al. Social phobia: a review of a neglected anxiety disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 42, p. 729-736, 1985.

LIEBOWITZ, M. R. et al. Phenelzine versus atenolol in social phobia. **Arch Gen Psychiatry**, v. 49, p. 290-300, 1992.

LIMA, V. T. M. et al. BUSPIRONA AUMENTA A DENSIDADE DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS D2- SÍMILE EM CORPO ESTRIADO DE RATO. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, São Paulo, v. 6, n. 1, ISSN 0004-282X, março 2002.

LORENZO, D., TAI-SERAFFINI, L., SANTOS, A.C., FRIZZO, C.D., Achyrocline satureioides essential oils from Southern Brazil and Uruguay. **Planta Medica**, v. 66, p. 476– 477, 2000.

KNAPP, L. Fitoterapia abre novos campos de pesquisa. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, p. 6, 2001.

JONES, G. H. et al. Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural response and postmortem and in vivo neurochemistry. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.43, n°1, p.17-35 september, 1992.

SADOCK, B. SADOCK V. **Kaplan e Sadock de Comprehensive Textbook of Psychiatry**, p. 1441-1503, 2005.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E., Herbal Extracts and Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and the Enhancement of Human Brain Function, **American Society for Nutrition**, v. 2, p. 32–50, 2011.

KINRYS, G.; COLEMAN, E.; ROTHSTEIN, E. Natural remedies for anxiety disorders: potential use and clinical applications. **Depress Anxiety**, v. 26, n. 3, p. 259-265, 2009.

KURIYAMA H, WATANABE S, NAKAYA T, SHIGEMORI I, KITA M, YOSHIDA N, ET AL. Immunological and psychological benefits of aromatherapy massage. **Evid Based Complement Alternat Med**, v.2, p.179–184, 2005.

KYLE G. Evaluating the effectiveness of aromatherapy in reducing levels of anxiety in palliative care patients: results of a pilot study. **Complement Ther Clin Pract**, vol. 12, p. 148–155, 2006.

LEHRNER J, M. G. L. S. J. P. D. L. Ambient odors of orange and lavender reduce anxiety and improve mood in a dental office. **Urban ethnobotany**, Rio de Janeiro, v. 19, p. 333-342, 2009.

LEITÃO, F. et al. Urban ethnobotany in Petrópolis and Nova Friburgo (Rio de Janeiro, Brasil). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1, p. 333-342, 2009.

LOBATO, A. M. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais da Amazônia. **Acta Amazônica**, v. 19, p. 355-363, 1989.

LORENZI, H.; ABREU MATOS, F. J. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, p. 544, 2002.

LOUIS M, KOWALSKI SD, Use of aromatherapy with hospice patients to decrease pain, anxiety, and depression and to promote an increased sense of well-being. **Am J Hosp Palliat Care**, v. 19 p.381–386, 2002.

Mc LAFFERT, F W.; STAUFFER, D. **The Wiley /NBS Registry of Mass Spectral Data**. John Wiley Sons, NewYork, v.1, 1989.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Proposta do Plano de Acção para a Reestruturação e Desenvolvimento dos Serviços da Saúde Mental em Portugal**. Portugal: 2007-2016.

MORILAK, D. A.; FRAZER, A. Antidepressants and brain monoaminergic systems: a dimensional approach to understanding their behavioural effects. **International Journal of Neuropsychopharmacology** , v. 7, p. 193-218, 2004.

MOTA, F.M, CARVALHO, H.H.C AND WIEST, J.M. Atividade antibacteriana in vitro de inflorescências de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. - Asteraceae ("macela", "marcela") sobre agentes bacterianos de interesse em alimentos. **Rev. bras. plantas med.**, vol.13, no.3, p.298-304. ISSN 1516-0572, 2011.

MUSCATELLO, M. R. et al. Clinically relevant drug interactions in anxiety disorders. *Hum. Psychopharmacol. Clin.*, v. 27, n. 3, ISSN 239-253, 2012.

NETO, C.; GAUER, J. C.; FURTADO, R. **Psiquiatria para estudantes de medicina**, , EDIPUCRS, Porto Alegre, 2003.

NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**, v. 70, p. 461–477, 2007.

PAGOTTOI, L. F. et al. Prazosina de liberação lenta para pacientes com transtorno do estresse pós-traumático resistentes aos ISRS. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 39, n. 5, ISSN 0101-6083, 2012.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrino**, v. 22, p. 502-548, August, 2013.

PACAK K, PALKOVITS M. Stressor specificity of central neuroendo crine responses: implications for stress-related disorders. **Endocrine Reviews**, v.22, n4, p. 502–548, agosto, 2001.

PAXINOS G., WATSON C.. **The Rat Brain In Stereotaxic Coordinates**. San Diego: Academic, 1997.

PEGORARO, J. L. et al. O artesanato Pataxó — tradições, significados e simbolismos. **PESQUISA EM DEBATE**, v. 4, n.3, ISSN 1808-978X, 2006.

PELLOW S, CHOPIN P, FILE SE, BRILEY M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v 14, n. 3, p. 149–67, 1985.

PEREIRA, L.P.; LUZ, L.P. TEDESCO,S.B.;SILVA, A.C.F. Número de cromossomos em população de *Achyroclines satureioides* LAM. (Marcela) do Estado do Rio Grande do SUL, Brasil. *Ciênci Rurar*, Santa Maria, v.36, n2np.678-681, mar-abr, 2006.

PERRY , N.; PERRY , E. Aromatherapy in the management of psychiatric disorders. **Clinical and Neuropharmacological Perspectives. CNS Drugs** , v. 20, p. 257–280., 2006.

PUHLMANN, J.; KNAUS, U.; TUBARO, L.; SCHAEFER, W.; WAGNER, H. Immunologically active metallic ion-containing polysaccharides of *Achyrocline satureioides*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2617-2621, 1992.

RABBANI M, SAJJADI SE, ZAREI HR. Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. **J Ethnopharmacol**, v89, p. 271-276, 2003.

RAVINDRAN, L. N.; STEIN, M. B. The pharmacologic treatment of anxiety disorders: a review of progress. **J. Clin. Psychiatry**, v. 71, n. 7, p. 839-854, 2010.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Prot. vol 29**, p. 913-920, 2010.

RETTA, et al. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 38, p. 27-38, 2012.

RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS. DAF/SCTIE/MS – RENISUS; Ministério da Saúde. Brasília, Distrito Federal, 2009. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=3027. Acessado em: outubro de 2013.

RIBEIRO L, KAPCZINSK F. ANSIEDADE IN: KAPCZINSKI F, QUE VEDO J, IZQUIERDO I, Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos. Porto Alegre. Artmed editora; p. 133-141, 2000.

RITTER M.R., SOBIERAJSKI G.R., SCHENKEL EP, MENTZ L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipé, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, julho 2002.

ROCHA, M.; FULGÊNCIO, S. F.; RABETTLA, C.; NICOLAU, M.; POLI, A.; SIMÕES, C.M.; RIBEIRO DO VALE, R. M. Effects of hydroalcoholic extracts of *Portulaca pilosa* and *Achyroline satureioides* on urinary sodium and potassium excretion. **J. Ethnopharmacol.**, v. 43, n.3, p. 179-183, 1994.

RODGERS, R.J., CAO, B.J., DALVI, A., Holmes,. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, p. 289–304, 1997.

RUBALCAVA CL, G. A. Noradrenaline-serotonin interactions in the anxiolytic effects of 5-HT(1A) agonists. **Behav Phamacol**, v. 5, n. 1, p. 42-51, 1994.

SADOCK, J.; VIRGINIA A. SADOCK. **Manual de farmacologia psiquiátrica de Kaplan**. 3ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

SANTOS, E.G.; SIQUEIRA, M.M. Prevalência dos transtornos mentais na população adulta brasileira: uma revisão sistemática de 1997 a 2009. **J. Bras. Psiquiatr.**, v.59, p.238-246, 2010.

SATOU, T; MURAKAMI, S; MATSUURA, M; HAYASHI, S; KOIKE, K. Anxiolytic effect and tissue distribution of inhaled *Alpinia zerumbet* essential oil in mice. **Natural Product Communications**, v.5 n.1, p.143-146, 2010.

SERRADEIL-LE GAL, C. et al. "Nonpeptide vasopressin receptor antagonists: development of selective and orally active V1a, V2 and V1b receptor ligands". **Progress in brain research**, v. 139, p. 197-210, ISSN ISBN 978-0-444-50982-6, 2002.

SIEGHART, W. et al. A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha(+)$ $\beta(-)$ interface. **Br. J. Pharmacol**, v. 166, n. 2, p. 476-485, Maio 2012.

SILVA, F. L. A.; OLIVEIRA, RAG; ARAÚJO, E. C. Uso de Plantas Medicinais pelos Idosos em uma Estratégia Saúde da Família. *Revista Enfermagem UFPE* [Online]. Disponível em: [http://www.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/viewFile/400/pdf_3.481\(2\), 9-16p., 2008](http://www.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/viewFile/400/pdf_3.481(2), 9-16p., 2008).

SILVA, R. E. D.; MACHADO, R.; RITTER, M.. Espécies de “macela” utilizadas como medicinais. **Pesquisas Botânica**, São Leopoldo, v. 58, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 12, p. 35-40, 2002.

SIMÕES, C.M.; RECHIN.; LAPA, A. J. Investigação Farmacologica do Extrato Aquoso de Folhas/Caules de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Dc., Compositae (Marcela). **Caderno de Farmácia**, Porto Alegre. RS, v. 1, n. 2, 1985.

SIMÕES CMO., SCHENKEL EP, BAUER L., LANGELOH A., Pharmacological investigations on *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. **J Ethnopharmacol** v., 22, p., 281-293, 1988.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A Pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Curitiba, v. 12, p. 35- 40, 2002.

STAHL S.M.. **Psicofarmacologia-Base Neurocientífica e Aplicações Práticas**.

2^a edição. São Paulo: MEDSI, 130-36, 2012.

STAHL, S. M. Describing an Atypical Antipsychotic: Receptor Binding and Its Role in Pathophysiology. **J. Clin. Psychiatry**, v. 5, n. 5, p. 9-13, 2003.

STOPPE, JR., A.; LOUZÃ NETO, M. R., 1997. **Depressão na Terceira Idade: Apresentação Clínica e Abordagem Terapêutica**. São Paulo: Lemos Editorial.

SVED, A. F. et al. The locus coeruleus, Barrington's nucleus, and neural circuits of stress. **Physiol. Behav**, v 77, p.737-742, 2002.

TAYLOR FB, L. K. T. C. M.-F. M. P. E. K. E. E. A. Daytime prazosin Reduces Psychological Distress To Trauma Specific Cues in Civilian Trauma Post Traumatic Stress Disorder. **Biological Psychiatry** , v. 59, n. 7, p. 577-581, 2006.

TESKE, M.; TRENTINI, A.M. Herbarium : compêndio de fitoterapia. 4. ed. Curitiba: **Herbarium Laboratório Botânico**, p.317, 2001.

Tortoriello J, Lozoya X. **Effect of Galphimia glauca methanolic extract on neuropharmacological tests**. *Planta Med* 58: 234-236, 1992

TUNNICLIFF G, E. A. In: TUNNICLIFF G, E. A. **Buspirone: mechanisms and clinical aspects**. San Diego: Academic Press, p. 19-34, 1991.

URUGUAY, I. N. D. I. A. D. INIA - **Estudio en Dometicación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas nativas**, 2004.

VEIGA-JUNIOR V.F.. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev. Bras. Farmacogn**. v.18, p.,308-313, 2008.

VIANA GSB, VALE TG, PINHO RSN, MATOS FJA. Antinociceptive effect on the essential oil from *Cymbopogon citratus* in mice. **J Ethnopharmacol**, v.70, p. 323-327, 2000.

WIEST, J.M. *et al*. Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.1-7, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL. Consortium in Psychiatric Epidemiology. **Cross-national comparisons of the prevalences and correlates of mental disorders**. *Bull. World Health Organ*. 78(4), 413-426, 2000,

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of mental disorders : effective interventions and policy options.** (ISBN 92 4 159215 X), Geneva. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Research capacity for mental health in low- and middle-income countries.** Global Forum for Health Research and World Health Organization. Geneva: [s.n.]. 2007.