

IRINÉIA PAULINA BARETTA

**“EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO E ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO BRUTO
HIDROALCÓOLICO DE *Achillea millefolium* L (ASTERACEAE) EM MODELOS
ANIMAIS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná (UFPR), como pré-
requisito parcial à obtenção do título de Doutor em
Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Andreatini

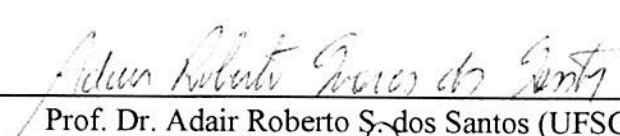
**CURITIBA
2012**

PARECER

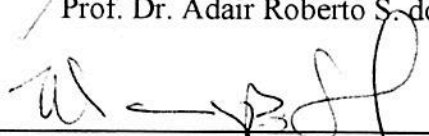
A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado "EFEITO TIPO ANSIOLÍTICO E ANTIDEPRESSIVO DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOÓLICO DE *Achillea millefolium* L (ASTERACEAE) EM MODELOS ANIMAIS", de autoria da pós-graduanda Irinéia Paulina Baretta, sob orientação do sob orientação do Prof. Dr. Roberto Andreatini e composta pelos professores: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC), Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Barbato Frazão Vital (UFPR), Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (UFPB) e Prof^ª. Dr^ª. Rubia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (UEM). De acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 2 de março de 2012.



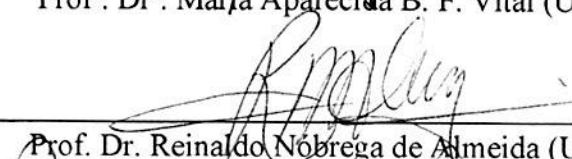
Prof. Dr. Roberto Andreatini (Presidente - Farmacologia - UFPR)



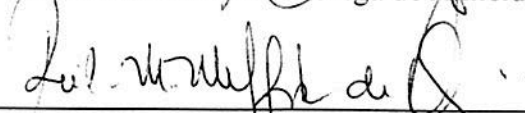
Prof. Dr. Adair Roberto S. dos Santos (UFSC)



Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida B. F. Vital (UFPR)



Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida (UFPB)



Prof^ª. Dr^ª. Rubia Maria Monteiro Weffort de Oliveira (UEM)

Aos meus pais (Anair e Artur) pelo amor incondicional, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

A minha irmã (Ieda), meu irmão (Paulo), minha cunhada (Janete), meu cunhado (Vagner), e meus sobrinhos Karoline, Teodoro e Nicolas pelo amor, incentivo, dedicação e força.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, sabedoria e força para nunca desistir, por sempre ter iluminado meu caminho, e por permitir-me conhecer e compartilhar com pessoas maravilhosas durante este período.

Ao professor Dr. Roberto Andreatini, meu extraordinário orientador, pela oportunidade, apoio pessoal e científico, paciência, dedicação e exemplo de vida e perseverança. “Quando crescer, quero ser como você”. E como disse o Fábio TC “....por ser exemplo de que é possível conquistar o conhecimento sem se tornar arrogante, ter autoridade sem ser autoritário e ser duro sem perder a sensibilidade”.

Obrigada também a sua esposa, Dra. Estela Maris Losso, pelo carinho, amizade e aconchego em momentos difíceis durante esta jornada.

As professoras e amigas “irmãs”, Dra. Alexandra Acco e Dra. Daniela Cabrini, pelo incentivo, amizade, paciência, dedicação e carinho. Vocês são únicas!

À professora e amiga Dra. Maria Consuelo A. Marques, pelo apoio, exemplo de vida e por sua crucial dedicação principalmente no final desta pós-graduação.

A professora Dra. Janaina M. Zanoveli, obrigada pela amizade, carinho e em especial pelo auxílio técnico em determinados momentos.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia que de uma forma ou outra, sempre me receberam com um sorriso e um abraço. Obrigada pelos ensinamentos, pela amizade, pelo carinho e respeito a mim dedicado. Gostaria de falar de cada um, mas sintam-se abraçados e admirados.

A todos os alunos e ex-alunos de pós-graduação e iniciação científica do Departamento de Farmacologia, pela amizade, apoio, momentos de descontração e auxílio técnico. Jamais esquecerei nossos momentos. Agradeço a todos, mas em especial a: Ester, Pamela, Marcela, Lea, Diego, Rodrigo, Bruno, Patrícia, Lucélia, Janaina, Cíntia, Daniel, Luiza, Sandra, Rita, Izadora, Thiago, Yanna e Ewellyn.

Aos meus amigos, colegas de pós-graduação e “irmãos de coração”, Emerson (Cambi) e Arquimedes (Kico) pela convivência, apoio, companheirismo, incentivo e momentos inesquecíveis. Valeu amigos, jamais esquecerei tudo que vivemos!

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia e do Biotério Central pelo apoio, carinho e solidariedade sempre que necessário.

A todos os meus (ex-) alunos de iniciação científica, mas em especial: Thiago, Regiane, Vanessa, Maísa, José Borba, Tatiane e Izabela pela colaboração, paciência e dedicação nestes anos.

Aos professores e amigos Dr. Juliano Ferreira (UFSM), Dra. Élide P. dos Santos (UFPR) e Dr. Euclides L. Cardozo Jr (UNIPAR) pela amizade e colaboração neste trabalho.

Aos meus superiores, colaboradores e companheiros da UNIPAR, que durante estes anos acreditaram em mim, compreenderam e permitiram a realização deste trabalho. Sou grata a todos. Em especial a vocês, Profa. Maria Regina e Profa. Sonia de Oliveira, pela amizade, apoio e paciência.

A minha “fiel escudeira”, Sirlei, obrigada pela sua eficiência e dedicação.

Aos meus primos, Ana Lúcia, Rolney e Lucas, pelo apoio e dedicação em momentos importantes de minha vida.

Aos animais, meu respeito e gratidão.

A todos que, de algum modo, contribuíram para a execução deste trabalho, obrigada.

“A princípio bastaria ter saúde, dinheiro e amor, o que já é um pacote louvável, mas nossos desejos são ainda mais complexos..... Invente seu próprio jogo. Faça o que for necessário para ser feliz. Mas não se esqueça que a felicidade é um sentimento simples, você pode encontrá-la e deixá-la ir embora por não perceber sua simplicidade. Ela transmite paz e não sentimentos fortes, que nos atormenta e provoca inquietude no nosso coração. Isso pode ser alegria, paixão, entusiasmo, mas não felicidade.”

(Mario Quintana)

SUMÁRIO

	Lista de Tabelas	I
	Lista de Abreviaturas	li
	Lista de Figuras	lii
	Resumo	lv
	Abstract	v
I	INTRODUÇÃO	21
1.1	Plantas Medicinais	21
1.2	<i>Achillea millefolium</i> L	28
1.2.1	Descrição botânica	28
1.2.2	Distribuição	29
1.2.3	Sinonímia	30
1.2.4	Etnofarmacologia	30
1.2.5	Composição Química	33
1.2.6	Propriedades Farmacológicas	35
1.2.7	Toxicologia	38
1.2.8	<i>Achillea millefolium</i> L e o Sistema Nervoso Central	40
II	HIPÓTESE	46
III	OBJETIVOS	
3.1	Objetivo geral	47
3.2	Objetivos específicos	47
IV	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Material Biológico	49
4.2	Material Botânico	50
4.2.1	Preparação do extrato bruto hidroalcólico (EBHA)	52
4.2.2	Análise Fitoquímica Preliminar	53
4.3	Drogas e Sais	57
4.4	Modelos Experimentais	58
4.4.1	Triagem Farmacológica Comportamental	58
4.4.2	Avaliação da Atividade e Desempenho Motor	58
4.4.2.1	Teste da Barra giratória (rota-rod)	58

4.4.2.2	Teste de Abdução das patas posteriores	59
4.4.3	Avaliação da Atividade Exploratória e Locomotora	61
4.4.3.1	Teste do Campo Aberto	61
4.4.4	Avaliação de Atividades Centrais Específicas	62
4.4.4.1	Ação Ansiolítica	62
4.4.4.1.1	Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)	62
4.4.4.1.2	Teste de Esconder Esferas	64
4.4.4.1.3	Teste de Neofobia ou Hipofagia Emocional	65
4.4.4.1.4	Teste da Placa Perfurada (Hole-board)	65
4.4.4.2	Ação Antidepressiva	66
4.4.4.2.1	Teste de Suspensão pela Cauda	66
4.4.4.2.2	Teste de Natação Forçada	67
4.5	Protocolos Experimentais	69
4.5.1	Tratamento Agudo	69
4.5.1.1	Avaliação da administração de <i>A. millefolium</i> L nas atividades exploratória, motora e ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.	69
4.5.1.2	Avaliação da administração de apigenina, rutina e narigenina nas atividades exploratória, motora e ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.	71
4.5.1.3	Influência da administração prévia com picrotoxina ou flumazenil na atividade motora e na ação ansiolítica com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L em camundongos em diferentes modelos animais.	74
4.5.1.4	Avaliação da administração com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L nas atividades locomotora e antidepressiva em camundongos em diferentes modelos animais.	75
4.5.2	Tratamento Repetido.	76
4.5.2.1	Avaliação da administração com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L, durante 25 dias, nas atividades exploratória, motora e ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.	77
4.5.2.2	Administração oral, durante 25 dias, com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L e a atividade locomotora e antidepressiva em camundongos em diferentes modelos animais.	79
4.6	Binding de Receptor Benzodiazepínico	81
4.6.1	Preparação das Membranas	81

4.6.2	Ensaio de <i>Binding</i>	81
4.7	Dosagens de Monoaminas e Metabólitos no encéfalo de camundongos por Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção eletroquímica (HPLC-DE)	82
4.8	Análise Estatística dos Resultados	84
V	RESULTADOS	86
5.1	Análise Fitoquímica Preliminar	86
5.2	Triagem Farmacológica Comportamental	88
5.3	Efeito da administração aguda e repetida (25 dias) via oral, com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L na atividade motora em camundongos em diferentes modelos animais.	89
5.4	Efeito da administração aguda e repetida (25 dias) via oral, com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L na atividade ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.	91
5.5	Efeito da administração prévia com picrotoxina ou flumazenil seguida pela administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L, em camundongos, na atividade ansiolítica em diferentes modelos animais.	96
5.6	Efeito da administração aguda via oral, com os flavonoides apigenina, rutina e narigenina na atividade locomotora e ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.	100
5.7	Ensaio de <i>Binding</i> [³ H]-flunitrazepam	105
5.8	Efeito da administração aguda e repetida (25 dias), via oral, com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L na atividade antidepressiva em camundongos em diferentes modelos animais.	106
5.9	Dosagens de monoaminas e metabólitos no encéfalo de camundongos por HPLC-DE.	109
VI	DISCUSSÃO	110
VII	CONCLUSÕES	135
VIII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
IX	ANEXOS	168
	Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Experimentação Animal da UNIPAR	168
	Anexo 2 – Artigo Publicado - referência	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Solvente e os respectivos metabólitos secundários extraídos.	53
Tabela 2	Reações do EBHA de <i>A. millefolium</i> L para identificação de antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavononóis.	54
Tabela 3	Reações do EBHA de <i>A. millefolium</i> L para identificação de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.	55
Tabela 4	Avaliação fitoquímica preliminar do EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	86
Tabela 5	Efeitos do tratamento agudo e repetido com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L e diazepam no teste do campo aberto.	96
Tabela 6	Efeitos do tratamento prévio com flumazenil ou picrotoxina sobre os efeitos do EBHA de <i>A. millefolium</i> L (300 mg/kg) em camundongos expostos ao teste do campo aberto.	99
Tabela 7	Efeito do EBHA de <i>A. milleflium</i> L administrado repetidamente nos níveis de serotonina (5-HT), noradrenallina (NA) e dopamina (DA) e seus metabólitos presentes no córtex frontal, hipocampo, amígdala e estriado de ratos.	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a.C	Antes de Cristo
AM	<i>Achillea millefolium</i> L
<i>A. millefolium</i> L	<i>Achillea millefolium</i> L
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de variância
AP	Apigenina
AST	Aspartato aminotransferase
BZD	Benzodiazepínicos
BA + BF	Braços abertos + Braços fechados
Ci	Curie - unidade de Atividade de um radionuclídeo
Cm	Centímetro
DA	Dopamina
DE	Detecção eletroquímica
d-GAIN	d-galatosaminase
DHPG	Dihidroxifenilglicol
DOPAC	3,4-ácido dihidroxifenilacético
DZP	Diazepam
EBHA	Extrato Bruto Hidroalcólico liofilizado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
EPM	Erro padrão da média
FDA	Food and Drug Association
FeCl ₃	Percloroeto de ferro
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
5-HIAA	5-hidroxindolacetico

HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazin-1-etanosulfônico
5-HT	Serotonina
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
HVA	Ácido homovanílico
IMI	Imipramina
i.p.	Via intraperitoneal
ISRS	Inibidor seletivo da recaptação da serotonina
K _i	Constante de equilíbrio de dissociação
LCE	Labirinto em cruz elevado
LPS	Lipopolissacarídeo
Min	Minutos
mL	Mililitros
mL/kg	Mililitros por quilo de peso
mL	Mililitros por minuto
mmol	Milimoles
mM	Milímetros
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilo de peso
mV	Milivolts
N	Número de animais por grupo experimental
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NG	Naringenina
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
nM	Nanomoles
OMS	Organização Mundial de Saúde

PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Rpm	Rotações por minuto
RT	Rutina
SUS	Sistema Único de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
TOC	Transtorno Obsessivo-compulsivo
TNF	Teste de Natação Forçada
Tris-HCl	Tris-hidrocloreto
TSC	Teste de Suspensão pela cauda
UV	Ultravioleta
veic	Veículo / Controle
v.o.	Via oral
v/v	Volume/volume
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
μM	Micromolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Canteiro com <i>Achillea millefolium</i> L	29
Figura 2	Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense - UNIPAR.	51
Figura 3	Canteiros para cultivo de plantas medicinais do Horto de Plantas Medicinais.	51
Figura 4	Barra Giratória (rota-rod).	59
Figura 5	Teste de Abdução das Patas Posteriores.	60
Figura 6	Campo Aberto.	62
Figura 7	Labirinto em Cruz Elevado.	63
Figura 8	Teste de Esconder Esferas.	64
Figura 9	Teste da Neofobia ou Hipofagia emocional	65
Figura 10	Placa Perfurada.	66
Figura 11	Teste de Suspensão pela Cauda.	67
Figura 12	Teste de Natação Forçada.	68
Figura 13	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade motora, nos testes da barra giratória e abdução das patas posteriores; e a atividade ansiolítica na hipofagia emocional após administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	70
Figura 14	Desenho experimental do experimento de avaliação das atividades exploratória e ansiolítica nos testes de campo aberto e LCE após administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	71
Figura 15	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade ansiolítica no teste de esconder esferas após administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	71
Figura 16	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade motora, nos testes da barra giratória e abdução das patas posteriores; e a atividade ansiolítica na hipofagia emocional após administração aguda com os flavonóides apigenina, rutina e naringenina.	72

Figura 17	Desenho experimental do experimento de avaliação das atividades exploratória e ansiolítica nos testes da placa perfurada e LCE após administração aguda com os flavonóides apigenina, rutina e naringenina.	73
Figura 18	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade ansiolítica no teste de esconder esferas após administração aguda com os flavonóides apigenina, rutina e naringenina.	73
Figura 19	Grupos experimentais e desenho experimental do experimento de avaliação das atividades exploratória e ansiolítica nos testes de campo aberto e LCE após administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L e tratamento prévio com flumazenil ou picrotoxina.	75
Figura 20	Desenho experimental do experimento de avaliação das atividades exploratória e antidepressiva nos testes da placa perfurada e suspensão pela cauda após administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	76
Figura 21	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade antidepressiva no teste da natação forçada após administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	76
Figura 22	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade motora, nos testes da barra giratória e abdução das patas posteriores; e a atividade ansiolítica na hipofagia emocional após administração repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	78
Figura 23	Desenho experimental do experimento de avaliação das atividades exploratória e ansiolítica nos testes de campo aberto e LCE após administração repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	79
Figura 24	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade ansiolítica no teste de esconder esferas após administração repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	79
Figura 25	Desenho experimental do experimento de avaliação das atividades exploratória e antidepressiva nos testes da placa perfurada e suspensão pela cauda após administração repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	80
Figura 26	Desenho experimental do experimento de avaliação da atividade antidepressiva no teste da natação forçada após administração repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L.	80
Figura 27	Aparelho de HPLC.	84

Figura 28	Efeito da administração aguda e repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L ou diazepam no teste do rota-rod.	90
Figura 29	Efeito da administração aguda e repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L ou diazepam no teste da abdução das patas posteriores.	91
Figura 30	Efeito da administração aguda e repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L ou diazepam no teste da hipofagia emocional.	92
Figura 31	Efeito da administração aguda e repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L. ou diazepam em animais submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado.	93
Figura 32	Efeito da administração aguda e repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L. ou diazepam no teste de esconder esferas.	95
Figura 33	Efeito da administração aguda de flumazenil ou de picrotoxina no teste do labirinto em cruz elevado.	97
Figura 34	Efeito da administração aguda com EBHA de <i>A. millefolium</i> L após tratamento prévio de flumazenil ou picrotoxina no teste do labirinto em cruz elevado.	98
Figura 35	Efeito da administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolim</i> L, diazepam, apigenina, rutina e narigenina no teste do labirinto em cruz elevado: % de entradas e de tempo nos braços abertos.	101
Figura 36	Efeito da administração aguda com o EBHA de <i>A. millefolim</i> L, diazepam, apigenina, rutina e naringenina no teste do labirinto em cruz elevado: número total de entradas.	103
Figura 37	Efeito da administração aguda com odo EBHA de <i>A. millefolium</i> L, diazepam, apigenina, rutina e naringenina no teste de esconder esferas.	104
Figura 38	Efeitos do EBHA de <i>A. millefolium</i> L e diazepam no <i>binding</i> específico de [3H]-flunitrazepam em membranas cerebrais de ratos.	105
Figura 39	Efeito da administração aguda e repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L., imipramina e diazepam no teste de natação forçada: tempo de imobilidade (A) e latência para a imobilidade (B).	107
Figura 40	Efeito da administração aguda e repetida com o EBHA de <i>A. millefolium</i> L., imipramina e diazepam no teste de suspensão pela cauda: tempo de imobilidade (A) e latência para a imobilidade (B).	108

RESUMO

Achillea millefolium L (Asteraceae; *A. millefolium* L), popularmente conhecida como "mil-Folhas" (Yarrow), tem sido utilizada na medicina popular para tratamento de distúrbios gastrointestinais, inflamação, ansiedade e insônia. No entanto, poucos estudos tem sido realizados para verificar sua ação no sistema nervoso central. Assim, o presente estudo foi realizado para avaliar os potenciais efeitos do tipo-ansiolítico e do tipo-antidepressivo do extrato hidroalcoólico de *A. millefolium* L em diferentes modelos animais. Os efeitos do extrato hidroalcoólico das partes aéreas da *A. millefolium* L. foram avaliados em camundongos submetidos aos testes do labirinto em cruz elevado, de esconder esferas, de hipofagia emocional, do campo aberto, de natação forçada (TNF) e de suspensão pela cauda (TSC). Adicionalmente, a mediação GABA_A/benzodiazepínico (BDZ) sobre os efeitos da *A. millefolium* L, foi avaliada pelo pré-tratamento com o antagonista não-competitivo do receptor GABA_A, a picrotoxina, e com o antagonista BZD, o flumazenil, e pela ligação do [3H]-flunitrazepam ao sítio BDZ do receptor GABA_A. Além disso, também foi avaliado o efeito da administração repetida de *A. millefolium* L nos níveis de monoaminas (e seus metabólitos) em diferentes áreas cerebrais. Diazepam e imipramina foram utilizados como controle positivo para os efeitos ansiolíticos e antidepressivos, respectivamente. Como *A. millefolium* L contém apigenina, um flavonóide com atividade do tipo ansiolítica, também foi investigado se apigenina pode ser o componente ativo do extrato da *A. millefolium* L. O extrato bruto da *A. millefolium* L exerceu efeito do tipo ansiolítico nos testes do labirinto em cruz elevado e de esconder esferas após administração aguda (30-600 mg/kg, v.o.) e repetida (30 e 300 mg/kg, v.o.; 25 dias) e sua administração nestas doses não alterou a atividade locomotora. No teste de hipofagia emocional, *A. millefolium* L (600 mg/kg) reduziu a ingestão de alimentos após o tratamento agudo. O perfil comportamental da *A. millefolium* L em modelos para a busca de drogas, com efeito tipo-ansiolítico foi semelhante ao perfil do diazepam (0,75 mg/kg, v.o.). Os efeitos da *A. millefolium* L no labirinto em cruz elevado não foram alterados pelo pré-tratamento com a picrotoxina, mas foram parcialmente bloqueados pelo flumazenil. Além disso, *A. millefolium* L não induziu quaisquer alterações no binding de [3H]-flunitrazepam. Apigenina não promoveu efeito do tipo-ansiolítico nos testes do labirinto em cruz elevado e de esconder esferas. A administração aguda do extrato hidroalcoólico das

partes aéreas de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg, v.o.) reduziu o tempo de imobilidade no teste da natação forçada, mas não no teste de suspensão pela cauda, embora a administração repetida (25 dias) tenha reduzido o tempo de imobilidade no TNF (30 mg/kg) e no TSC (30 e 300 mg/kg). Administração de imipramina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o tempo de imobilidade em ambos os testes com os dois esquemas de tratamento. A administração repetida do extrato de *A. millefolium* L (300 mg/kg, v.o.) aumentou os níveis de dopamina no córtex pré-frontal e hipocampo e os níveis de serotonina no estriado. Os resultados indicam que a administração, via oral, do extrato hidroalcoólico de *A. millefolium* L apresenta efeito do tipo ansiolítico e que provavelmente não foram mediados pela neurotransmissão GABA_A/BDZ e efeito tipo antidepressivo nos TNF e TSC, que pode estar relacionado com neurotransmissão dopaminérgica. Apigenina parece não contribuir para o efeito do tipo ansiolítico da *A. millefolium* L. Esses resultados tornam a *A. millefolium* L interessante para o desenvolvimento de um composto ansiolítico e/ou antidepressivo.

ABSTRACT

Achillea millefolium L (Asteraceae; *A. millefolium* L), popularly known as “mil-folhas” (yarrow), has been used as folk medicine for treatment of gastrointestinal disorders, inflammation, anxiety, and insomnia. However, very few studies have been conducted to verify its action in the central nervous system. Thus, the present study was carried out to evaluate in animal models the potential anxiolytic-like and antidepressant-like effects of hydroalcoholic extract of *A. millefolium* L. The effects of the hydroalcoholic extract from the aerial parts of *A. millefolium* L was evaluated in mice subjected to the elevated plus-maze, marble-burying, novelty-induced hypophagia, open-field, forced swim (FST) and tail suspension (TST) tests. Additionally, the GABA_A/benzodiazepine (BDZ) mediation of the effects of *A. millefolium* L was evaluated by pretreatment with the noncompetitive GABA_A receptor antagonist picrotoxin and the BDZ antagonist flumazenil and by [3H]-flunitrazepam binding to the BDZ site on the GABA_A receptor. Moreover, it was also evaluated the effect of repeated administration of *A. millefolium* L in monoamine (and their metabolites) levels in some discrete brain areas. Diazepam and imipramine were used as positive controls for anxiolytic and antidepressant effects respectively. Since *A. millefolium* L contain apigenin, a flavonoid with putative anxiolytic-like activity, it was also investigated if apigenin could be the active constituent of *A. millefolium* L extract. The hydroalcoholic extract of *A. millefolium* L exerted anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze and marble-burying test after acute (30-600 mg/kg, po) and repeated (30 and 300 mg/kg, po; 25 days) administration at doses that did not alter locomotor activity. In novelty-induced hypophagia, *A. millefolium* L (600 mg/kg) reduced food ingestion after acute treatment. The behavioral profile of *A. millefolium* L in models for search of anxiolytic-like drugs was similar to diazepam's profile (0,75 mg/kg, po). The effects of *A. millefolium* L in the elevated plus-maze were not altered by picrotoxin pretreatment but were partially blocked by flumazenil. Furthermore, *A. millefolium* L did not induce any changes in [3H]-flunitrazepam binding. Apigenin did not show anxiolytic-like effect on elevated-plus maze and marble-burying test. Acute administration of hydroalcoholic extract of aerial parts of *A. millefolium* L (30 and 300 mg/kg, po) reduced immobility time in the forced swim test but not in the tail suspension test, although repeated (25 days) administration reduced immobility time in the FST (30 mg/kg) and in the TST (30 and 300 mg/kg). Imipramine (10 mg/kg, po) administration

reduced immobility time in both tests with both treatment schedules. Furthermore, chronic *A. millefolium* L extract (300 mg/kg, po) increased dopamine levels in the prefrontal cortex and hippocampus and serotonin levels in the striatum. The results indicate that the orally administered hydroalcoholic extract of *A. millefolium* L exerted anxiolytic-like effects that likely were not mediated by GABA_A/BDZ neurotransmission and an antidepressant-like effect in the FST and TST, which may be related to dopaminergic neurotransmission. Apigenin did not appear to contribute to anxiolytic-like effect of *A. millefolium* L. These results turn *A. millefolium* L as an interesting putative anxiolyte and antidepressant compound.

I. Introdução

1.1 Plantas Medicinais

Os medicamentos existentes no mercado são basicamente oriundos de síntese química ou de derivados da natureza como, por exemplo, os extratos, frações ou metabólitos secundários ativos obtidos de plantas medicinais. Desde os tempos mais antigos, produtos naturais tem sido uma importante fonte de agentes terapêuticos, particularmente aqueles originários de plantas (BAGATINI *et al.*, 2007). As plantas medicinais constituem uma das mais importantes fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico e são frequentemente utilizadas na prevenção, no tratamento e na cura de distúrbios, disfunções ou doenças em homens e animais (KOROLKOVAS, 1996; KAMBOJ, 2000; RATES, 2001; SAMY e GOPALAKRISHNAKONE, 2008).

Em vários países desenvolvidos, ou em desenvolvimento, o emprego de plantas medicinais é importante nos cuidados básicos de saúde da população e diferentes espécies vegetais são usadas popularmente como recurso terapêutico. No entanto, apesar do uso tradicional e do elevado consumo, não há estudos científicos que comprovem a efetividade ou mesmo a toxicidade de muitas das espécies utilizadas popularmente (CALIXTO, 2005; ROCHA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006).

Por longos períodos na história, o uso de plantas medicinais foi presente não só devido ao seu caráter alimentar, mas também às suas propriedades de cura, sejam elas reais ou ritualísticas. Os povos primitivos iniciaram a identificação de vegetais que melhor se adequavam ao uso medicinal, da época de colheita, das técnicas de extração e de modos de conservação. A maior contribuição em termos de conhecimentos quanto à utilização de plantas medicinais foi registrada com os

I. Introdução

egípcios, alastrando-se para outras regiões do mundo (CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008). Em meados dos séculos XVIII e XIX, químicos estudavam as plantas medicinais consagradas até o momento, com a finalidade de extrair, isolar e determinar a estrutura química de princípios ativos nelas presentes (PINTO *et al.*, 2002; CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008). Entretanto, até a metade do século XX, o uso de medicamentos de origem sintética tornou-se mais amplo que o uso de plantas medicinais, principalmente na sociedade ocidental, com destaque para os países desenvolvidos, visto que os considerados países em desenvolvimento permaneceram fazendo uso das propriedades curativas das plantas, certamente devido às difíceis condições econômicas de aquisição dos medicamentos sintéticos (KOROLKOVAS, 1996; FARNSWORTH, 1997; RATES, 2001; SPRINGFIELD *et al.*, 2005; FOGLIO *et al.*, 2007; GUPTA *et al.*, 2008; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization* – WHO/OMS), aproximadamente 60-80% da população mundial dependem essencialmente de plantas para os cuidados primários de saúde (SCHUSTER, 2001). Entretanto, mesmo a diversidade genética vegetal mundial sendo bastante expressiva, poucas espécies (15-17%) têm sido estudadas cientificamente para avaliação de suas qualidades, segurança e eficácia (SIMÕES *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2003; CALIXTO, 2005; SOARES *et al.*, 2006), sem grande aprofundamento nos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos (FOGLIO *et al.*, 2007; CALIXTO, 2005; HOSTETTMANN *et al.*, 2003; NODARI e GUERRA, 1999; CRAGG e NEWMAN, 1999; HAMBURGER *et al.*, 1991).

Newman e Cragg (2007) mostraram a importância dos produtos naturais para o desenvolvimento de novas drogas nos últimos 25 anos, principalmente para o

I. Introdução

tratamento do câncer e das doenças infecciosas: aproximadamente 60% dos medicamentos são oriundos de produtos naturais ou seus derivados. Dados recentes mostram que o percentual dos agentes anticancerígenos testados e aprovados derivados de produtos naturais é de aproximadamente 77,8% (NOGUEIRA *et al.*, 2010).

Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as espécies vegetais, adequadamente selecionadas, tratadas e preparadas, são matérias-primas para a produção de fitoterápicos e outros medicamentos. No entanto, as plantas medicinais são também utilizadas em práticas populares e tradicionais.

Eldin e Dunford (2001), apresentam a Fitoterapia como uma prática milenar, que ao longo de séculos, vem sendo utilizada e documentada por seu valioso conhecimento tradicional e popular decorrente de sua rica diversidade étnica e cultural, mencionando que em 2.800 a.C., os chineses já apresentavam uma lista com mais de 360 espécies de plantas utilizadas como remédio. Esses conhecimentos são fontes estratégicas de informações preliminares de eficácia ou toxicidade das plantas medicinais, inspirando muitos estudos científicos sobre essas propriedades terapêuticas. A tradicionalidade de uso contribui enormemente com o surgimento de medicamentos inovadores (ANVISA – NOTA TÉCNICA DO COMITÊ NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2010).

Uma planta medicinal ou suas partes é considerada droga vegetal, após processos de coleta, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada. Por outro lado, o derivado de uma droga vegetal são os produtos de extração da matéria-prima vegetal, como um extrato, tintura, óleo, cera e outros (ANVISA, 2004). Os fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal. Os

I. Introdução

fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (ANVISA - RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010).

O interesse pelos medicamentos derivados de plantas tem aumentado expressivamente em todo o mundo, principalmente nos países desenvolvidos da Europa e nos Estados Unidos. O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US\$ 14 bilhões de dólares anuais, sendo deste cerca de US\$ 3 bilhões somente na Alemanha, país que possui a mais desenvolvida indústria farmacêutica à base de vegetais, seguido pela França e Itália (CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008; ANVISA, 2010).

Os fitoterápicos e as plantas medicinais são hoje as classes de produtos que possuem maior potencialidade de crescimento no Brasil, sendo que as vendas têm crescido de 10 a 15% ao ano, porém ainda com pequena participação (2%, em média) no mercado de medicamentos (ANVISA, 2010).

Segundo estimativas da Associação Brasileira da Indústria de Fitoterápicos (Abifito), o mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de 40 bilhões de dólares, enquanto, no Brasil, se calcula que o faturamento esteja em torno de 1 bilhão de dólares (ANVISA, 2011). Os medicamentos fitoterápicos demonstram ser uma boa forma de investimento, porque apresentam uma taxa de crescimento de 10-15% ao ano, com os custos para pesquisa entre US\$ 3.000.000 a 7.000.000

I. Introdução

enquanto que para os medicamentos sintéticos esta taxa é de 4% ao ano, com os custos, em média, entre U\$ 250.000.000 a 880.000.000 (RODRIGUES, 2005).

No Brasil, 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (FOGLIO *et al.*, 2007). Essa alternativa é utilizada tanto dentro de um contexto cultural, na medicina popular, quanto na forma de fitoterápicos. O Brasil apresenta uma grande perspectiva de crescimento para esta classe de medicamentos, pois o potencial da flora brasileira é indiscutível. Tem-se a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 55 mil espécies de plantas catalogadas de um total existente na terra estimado entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas, aproximadamente um quarto de todas as espécies conhecidas. Ainda faltam conhecimentos sobre as propriedades químicas, analíticas, farmacológicas e toxicológicas a fim de assegurar a eficácia e segurança das plantas medicinais. Com isso, cresce o interesse por parte dos pesquisadores brasileiros e pela indústria farmacêutica, em pesquisar as propriedades medicinais das plantas e desenvolver novos medicamentos (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Do ponto de vista do conhecimento científico, o Brasil também agrega vantagens nesta área. Calixto (2005) demonstrou em um levantamento baseado no número de trabalhos publicados em periódicos internacionais realizado no período entre 1984 a 2004, que a pesquisa com plantas tem apresentado um rápido crescimento. O Brasil, México e Argentina são os países que apresentam números mais expressivos de publicações, sendo o Brasil com 41,6%, o México com 19,9% e a Argentina com 19,5% (RODRIGUES, 2005; CALIXTO, 2005; CALIXTO e SIQUEIRA JR., 2008).

I. Introdução

Dentre as espécies existentes, 25% serão extintas até 2050 (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010). Os critérios de eficácia e segurança de plantas medicinais estão relacionados à qualidade, isto é, as plantas necessitam ser corretamente identificadas, cultivadas e coletadas, devem estar livres de material estranho, partes de outras plantas e contaminações inorgânicas e/ou microbianas (SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010). A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade (ANVISA RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 10, DE 9 DE MARÇO DE 2010).

Além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, as plantas medicinais têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica, como a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina. A avaliação dos efeitos farmacológicos pode ser usada como estratégia para descobrir novos fármacos de origem vegetal (PATWARDHAN *et al.*, 2004; SAMY e GOPALAKRISHNAKONE, 2008). A cada momento são relacionadas na literatura novas moléculas de origem em plantas medicinais, algumas de relevante ação farmacológica como a forskolina, o taxol e a artemisinina (FOGLIO *et al.*, 2007).

No Brasil, até março de 2008, foram registrados 512 medicamentos fitoterápicos. Destes, 432 são simples e 80 associados, nas diversas formas farmacêuticas. Já as espécies vegetais dos fitoterápicos registrados na ANVISA totalizam 162 espécies (CARVALHO *et al.*, 2008). Entre 2011 e fevereiro de 2012 foram encaminhados 107 processos para análise de espécies vegetais, sendo que destes 37 foram registrados até início de março e foi publicada a primeira edição do

I. Introdução

Formulário Nacional de Fitoterápicos com 83 monografias completas de plantas medicinais (ANVISA, 2012).

Com o intuito de promover o desenvolvimento sócio-econômico na área de plantas medicinais e fitoterápicos e proporcionar melhorias na qualidade de vida da população brasileira, foi instituída, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), por meio do Decreto nº 5.813. As ações decorrentes dessa Política constituem o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), aprovado pela Portaria Interministerial nº 2.960/2008, a qual também cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Associando a PNPMF com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), foi implantada a Fitoterapia nos Programas de Saúde Pública, que incentiva a pesquisa e desenvolvimento do uso de plantas medicinais e fitoterápicos, priorizando a biodiversidade nacional. A proposta é que, com esse incentivo, aumentasse o número de fitoterápicos registrados, com qualidade, segurança e eficácia comprovada, baseado em estudos pré-clínicos e clínicos, conforme a legislação vigente (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008; CARVALHO *et al.*, 2008).

Segundo a RDC nº. 14/10, o medicamento fitoterápico deve apresentar eficácia e segurança validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Pelo fato da RDC nº. 14/10 ser bastante ampla, devido aos assuntos abordados quanto aos fitoterápicos, têm-se normas complementares, algumas exclusivas a este tipo de medicamento, sendo elas: a IN nº. 05/10 (“Lista de referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”); RE nº. 90/04 (“Guia para a realização dos testes de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”) e a RE nº. 91/04

I. Introdução

(“Guia para a realização de alterações, inclusões, notificações e cancelamento pós-registro de fitoterápicos”) (ANVISA, 2010).

Do ponto de vista social, o estudo toxicológico é prioritário, mas do ponto de vista ético, clínico e empresarial é necessária uma validação completa. O aspecto relevante em relação ao uso de plantas medicinais pela população é que estas são usadas como medicamentos e devem ser avaliadas como tal, principalmente porque o seu uso deve considerar os fatores diferenciais não só em relação às plantas ‘per se’, mas também em relação às patologias e a reatividade individual aos tratamentos (BIAVATTI *et al.*, 2007). Com a crescente demanda por medicamentos e considerando-se o seu elevado custo, a busca de fontes alternativas e a implementação de projeto sistemático para o estudo e validação do uso de plantas medicinais parecem mais que justificáveis (BARBOSA-FILHO *et al.*, 1991; ALMEIDA *et al.*, 2001; ROCHA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; SILVA *et al.*, 2006; BIAVATTI *et al.*, 2007).

1.2 *Achillea millefolium* L

1.2.1. Descrição botânica

O nome do gênero, *Achillea*, provavelmente deriva de Aquiles, da mitologia grega, ou de Achillo, médico que utilizou partes da planta para tratar um soldado ferido (LeSTRANGE, 1977). Já o nome da espécie, *millefolium*, deriva da característica da folha, cujo aspecto assemelha-se a inúmeras folhas em uma só (CHANDLER, 1989).

Existem entre 110-140 espécies do gênero *Achillea* L (Asteraceae) amplamente distribuídas no hemisfério norte (APPLEQUIST, MOERMAN, 2011).

I. Introdução

Apresenta-se como uma planta herbácea perene, rizomatosa, ereta, aromática, com caules eretos, alcançando de 30 a 50 cm de altura. É ramificada na parte superior e suas folhas são alternas, compostas, finamente pinadas, de coloração verde acinzentada escura (Figura 1A e 1B; CHANDLER, 1989). As flores são pequenas, reunidas em inflorescências denominadas capítulos, reunidos em uma panícula terminal, apresentam coloração branca, rosada, magenta ou vermelha (CHANDLER, 1989; PACIORNIK, 1989).



A



B

Figura 1. A - Canteiro com *Achillea millefolium* L (Asteraceae); B- Vista panorâmica dos canteiros. Foto: Maísa Gonçalves, Horto Medicinal da Universidade Paranaense - Umuarama – PR., 2011.

1.2.2. Distribuição

A *A. millefolium* L é uma planta nativa na Europa, América do Norte, sul da Austrália e norte da Ásia e cultivada amplamente pelo mundo (ALONSO, 1998; APPLEQUIST, MOERMAN, 2011). No Brasil é amplamente cultivada em hortas

I. Introdução

(SOUZA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2006; LORENZI, MATOS, 2002; MARTINS *et al.*, 2000; PANIZZA, 1997).

Encontrada em diferentes climas, desde temperados a subtropicais; tolera condições climáticas variadas, desde sol pleno, geadas até frio intenso (-15°C) e resiste bem à seca. Cresce em prados, colinas, montanhas, terrenos baldios e a margem de caminhos. Apesar destas variações, é uma planta que prefere solo bem drenado, arenoso e arejado, com altitudes inferiores a 1500 metros (CHANDLER, 1989; CORRÊA JUNIOR *et al.*, 1994). Floresce na primavera e verão, em Curitiba nos meses de novembro a janeiro (CORREIA JUNIOR *et al.*, 1994), e na Europa e Estados Unidos, de maio e junho (OKA, 1998).

1.2.3. Sinonímia

Por ser amplamente cultivada, a planta recebe nomes populares regionais relacionados às suas propriedades medicinais e/ou a sua morfologia externa. No Brasil, é conhecida como pronto alívio, mil-folhas, milefólio, mil-em-rama, aquiléia, erva-dos-soldados, erva-dos-carpinteiros, erva-dos-militares, botão-de-prata, pestana de vênus (LORENZI, MATOS, 2002; MARTINS *et al.*, 2000; PANIZZA, 1997). Em outros idiomas é conhecida como *herbe à charpentier* (francês); *yarrow*, *milfoil*, *thousand leaf* (inglês); *millefoglie* (italiano); *milenrama*, *plumajillo*, *alhucema*, *milhojas cientoenrama* (espanhol) entre outros (FONT QUER, 1985; CHANDLER, 1989; MITICH, 1990; ALONSO, 1998; CÄCERES, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

1.2.4. Etnofarmacologia

Os primeiros relatos sobre o uso medicinal da *A. millefolium* L estão descritos no manual de medicina encontrado nas ruínas de Nippur, na Mesopotâmia,

I. Introdução

datado de aproximadamente 2200 a.C. (THORWALD, 1990). Vários autores citam a lenda de que Aquiles, o herói grego, foi curado de ferimentos de guerra com partes desta planta e, após sua cura, utilizou-a para estancar a hemorragia dos ferimentos de soldados, na guerra de Tróia (~1200 a.C.) (CHANDLER, 1989; ALONSO, 1998; CÁCERES, 1999; APPLEQUIST e MOERMAN, 2011). Soldados gregos e romanos carregavam a planta como parte de seus suprimentos e Dioscórides, herborista grego do primeiro século a.C., relatava que o uso de mil-folhas impedia a inflamação de feridas e úlceras (MITICH, 1990).

Por volta de 1450, na Europa, a *A. millefolium* L foi utilizada para aliviar cefaléias e dores de dente, para estancar sangramentos nasais e como preventivo de calvície. No século XVII foi utilizada no tratamento de hemorróidas, infecções, inflamações, fístulas e como tônico (FONT QUER, 1988; MITICH, 1990). Entre 1836 a 1882 as folhas e flores secas foram preconizadas pela Farmacopéia dos Estados Unidos como tônico, estimulante e emenagogo (CHANDLER, 1989).

Várias comunidades aborígenes norte-americanas utilizavam a *A. millefolium* L em diversas afecções como distúrbios gastrintestinais (TANTAQUIDGEON, 1974; HAMEL e CHILTOSKEY, 1975; HERRICK, 1977), resfriados, febre e quadros respiratórios e sua aplicação local na cura de feridas e inflamações (CHANDLER *et al.*, 1982; BLUMENTHAL *et al.*, 2000; WICHTL, 2004).

Tanto a planta como seu óleo essencial estão listados em várias farmacopéias européias e são utilizados oficialmente em países como França, Alemanha, Áustria, Suíça, Romênia e Hungria (BLUMENTHAL *et al.*, 2000). Pela Comissão Alemã a *A. millefolium* L compõe vários medicamentos para o tratamento de dispepsias, sintomas gastrintestinais e bactericida (BLUMENTHAL *et al.*, 2000; KOCEVAR *et al.*, 2008; APPLEQUIST e MOERMAN, 2011). O British Herbal

I. Introdução

Compendium (BRADLEY, 1992) também ressalta as ações espamolíticas, emenagoga e colerética da planta. Em Cuba, a *A. millefolium* L pertence ao grupo de plantas medicinais utilizadas pela população e preconizadas pelo Ministério de Saúde Pública (CUBA, 1993).

Propriedades terapêuticas atribuídas à mil-folhas, muitas vezes sem comprovação científica, mas citadas com frequência em publicações antigas e recentes, englobam ação cicatrizante, hemostática, analgésica, antiinflamatória, antipruriginosa, antipirética, laxativa, anti-helmíntica, anestésica local, calmante, sedativa, antiviral, contraceptiva, abortiva, expectorante, diurética e antihipertensiva (CASTRO, 1981; BALMÉ, 1982; CHANDLER *et al.*, 1982; DUKE, 1987; CHANDLER, 1989; CÁCERES, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2000; CORRÊA *et al.*, 2000; APPLEQUIST e MOERMAN, 2011).

As principais indicações terapêuticas populares da *A. millefolium* L, baseadas nas propriedades descritas anteriormente e citadas por vários autores, são:

- Leucorréia, menorragia, hematúria e incontinência urinária (PIO CORREIA, 1974);
- Epilepsia, histeria, melancolia e nervosismo (LeSTRANGE, 1977);
- Gastrite, úlcera gástrica, dispepsia nervosa e diarréia (NEGRI, 1979; OKA, 1998; BRUNETON, 1999; SCHULZ *et al.*, 2001; WILLUHN, 2002; DALSETER *et al.*, 2004; CAVALCANTI *et al.*, 2006; PIRES *et al.*, 2009);
- Ação antiquesada capilar (LEUNG e FOSTER, 1980; CHANDLER, 1989; ALONSO, 1998);
- Afecções de pele (úlceras, abscessos, eczemas, queimaduras, hematomas, alopecia e hiperhidrose (CASTRO, 1981; BALMÉ, 1982; CHANDLER *et al.*,

I. Introdução

1982; FRANCO, 1996; CÁCERES, 1999; BRUNETON, 1999; WILLUHN, 2002; FRANCO, 2003; CAVALCANTI *et al.*, 2006);

- Quadros vasculares como varizes, trombozes e hemorróidas (FONT QUER, 1985; ALONSO, 1998; CÁCERES, 1999);
- Hipertensão arterial (FONT QUER, 1985; De SOUZA *et al.*, 2011);
- Ação analgésica e anti-inflamatória em processos reumáticos e dolorosos como cefaléia, dismenorréia, odontalgia e artrite gotosa (CHANDLER, 1989; ALONSO, 1998; CORRÊA *et al.*, 2001; LORENZI e MATOS, 2002; YAEESH *et al.*, 2006; BENEDEK *et al.*, 2007; PIRES *et al.*, 2009);
- Afecções do trato respiratório como asma, pneumonia, tuberculose e gripe (CÁCERES, 1999; BLUMENTHAL *et al.*, 2000);
- Tratamento de condilomas, câncer e tumores de mama, fígado, baço e útero (CÁCERES, 1999);
- Tratamento de picada de cobra (MORS *et al.*, 2000).

1.2.5. Composição Química

As propriedades terapêuticas e o valor taxonômico da *A. millefolium* L geraram interesse sobre o estudo de sua composição química e o primeiro trabalho foi reportado a Hoffmann, em 1719, que realizou a extração do óleo volátil de cor azul (FALK *et al.*, 1974; CHANDLER, 1989); portanto esta planta é objeto de estudos a mais de 290 anos.

A domesticação e o cultivo aparecem como opções para a obtenção de matéria prima de interesse farmacêutico e redução de extrativismo nas formações florestais (REIS, MARIOT; 2002). O cultivo também se mostra importante sob o ponto de vista de homogeneidade da matéria prima obtida. Inúmeros são os fatores

I. Introdução

que interferem na concentração e composição química da *A. millefolium* L e das plantas em geral. Entre estes fatores estão o clima, o tipo de solo e os sais minerais presentes, a época da colheita, a água, o crescimento sazonal além de outros fatores de estresse (GOBBO-NETO e LOPES; 2007).

Em sua composição química, a literatura descreve a presença de óleo essencial (principalmente o camazuleno, além de cineol, borneol, pinenos, cânfora, mentol, eugenol, azuleno) (LORENZI, MATOS, 2002; BLUMENTHAL *et al.*, 2000; PANIZZA, 1997), flavonóides (apigenina e luteolina em maior frequência e com menor frequência a artemetina, rutina, quercetina, casticina, acacetina entre outros) (CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009; GUEDON *et al.*, 1993; TESKE, TRENTIN, 1997), sesquiterpenes (paulitina, isopaulitina, psilostacina C, desacetilmatricarina, sistenina) (CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009; GLASL *et al.*, 2002). Estão presentes também alcalóides (achileina) (MILLER e CHOW, 1954), esteróides (principalmente o β -sitosterol, além de estigmasterol, colesterol, campesterol), triterpenos (principalmente a α -amirina, além de β -amirina, taraxasterol, pseudotaraxasterol) (CHANDLER *et al.*, 1982), taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, ácidos graxos, alcalóides, e princípio amargo (LORENZI e MATOS, 2002; MARTINS *et al.*, 2000; PANIZZA, 1997; PIRES *et al.*, 2009).

Entre os principais constituintes da *A. millefolium* L com atividade central encontram-se os flavonóides, com percentuais que variam entre 0,30 e 0,33% (ROMERO *et al.*, 2007) até 0,59% (TUBEROSO *et al.*, 2009). Diferentes tipos de flavonóides são identificados, e seus percentuais variam de acordo com o tipo de extrato. Estudos em cromatografia de camada delgada (CCD) demonstraram que o extrato bruto hidroalcolico (EBHA) das partes aéreas de *A. millefolium* L, apresenta 0,59 % de flavonóides, sendo que deste total, 45,2% é de rutina, 7,9% é de

I. Introdução

apigenina, e 4,6% entre luteolina, artemetina e quercetina, sendo o restante de outros compostos fenólicos (CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2009; TESKE e TRENTIN, 1997; WAGNER, 1996; GUEDON *et al.*, 1993). Enquanto que o EBHA de 22 espécies de *Achillea* apresenta 13,3 a 27,9% de flavonóides, sendo que deste total, entre 3,38 e 9,17% é de apigenina, entre 1,35% e 1,72% de rutina e entre 4,21% e 4,48% de luteolina (BENETIS *et al.*, 2008). O EBHA de *A. millefolium* L, apresenta aproximadamente 28,4% de flavonóides, distribuídos em 14,2% de apigenina, 3,2% de rutina, 10,2% são de luteolina e 1,8% de outros compostos fenólicos (TRUMBECKAITE *et al.*, 2011). Já o extrato bruto metanólico de *A. millefolium* L, apresenta aproximadamente 12,5 a 13,3% de flavonóides, sendo que deste percentual a prevalência é de rutina (48 a 54%), enquanto que 9 a 10% são de apigenina e o restante de outros compostos fenólicos (KOCEVAR *et al.*, 2008). Para este estudo utilizamos os dados descritos por Tuberoso *et al.* (2009) onde 1g do EBHA equivale a 1 mg (0,1%) de apigenina.

1.2.6. Propriedades Farmacológicas

As espécies do gênero *Achillea*, principalmente a *A. millefolium* L, têm sido objeto de grande número de investigações farmacológicas. Os compostos fenólicos, como os flavonóides, são considerados um dos grupos farmacologicamente ativos mais importantes presentes em espécies do gênero *Achillea*. De acordo com a literatura (MARKHAN *et al.*, 1998; SOUZA *et al.*, 2005), o teor de flavonóides produzido por uma planta é considerado fator importante de proteção para as plantas contra a radiação ultravioleta (UV), anulando os efeitos deletérios de radicais livres produzidos no tecido por UV. Markhan *et al.* (1998) demonstraram que os

I. Introdução

flavonóides atuam também dissipando, de maneira inofensiva, a energia UV absorvida.

Assim, a atividade farmacológica da planta é atribuída a sesquiterpeno lactonas, azuleno (o principal constituinte do óleo essencial), e flavonóides. Apesar da Farmacopeia Europeia regulamentar apenas o óleo essencial e conteúdo proazulene (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2005), a presença de flavonóides é de grande importância, pois estas substâncias são conhecidas por apresentarem ação espasmolítica (LEMMENS-GRUBER *et al.*, 2006; YAEESH *et al.*, 2006), colerética (BENEDEK *et al.*, 2006), antioxidante (KONYALIOGLU e KARAMENDERES, 2005; CANDAN *et al.*, 2003) e antimicrobiana (CANDAN *et al.*, 2003).

A atividade espasmolítica verificada em intestino de coelho isolado e em íleo isolado de cobaia foi atribuída aos flavonóides (HALBERSTEIN, 2005; LEMMENS-GRUBER *et al.*, 2006). A atividade antiflogística de *A. millefolium* L. também foi atribuída aos flavonóides (BLUMENTHAL *et al.*, 2000).

Outras atribuições a *A. millefolium* incluem a ação anti-inflamatória, onde estudos mostraram este efeito para o composto azuleno (ZITTER-EGLESEER *et al.*, 1991; KASTNER *et al.*, 1993). Além disso, frações ricas em lactonas sesquiterpênicas e em flavonóides exibiram ação anti-flogística, por inibirem o edema induzido por óleo de cróton em orelha de camundongos (DELLA LOGGIA, 1992).

O flavonóide artemetina também apresentou efeitos anti-inflamatórios em ratos Wistar, nos quais a administração por via oral reduziu o edema de pata induzido pela carragenina, a formação de granuloma induzido por pequenas bolas de algodão e a permeabilidade vascular induzida por histamina. Além disso, foi avaliada também a segurança em relação ao seu uso prolongado, onde a artemetina

I. Introdução

administrada em ratos por via oral, em doses superiores às anti-inflamatórias, durante 30 dias, não alterou o consumo de água e de alimentos, o ganho de peso corporal, não alterou parâmetros hepáticos e renais, além de não ter desenvolvido úlceras e nem ter alterado o comportamento dos animais (SERTIÉ, 1990).

Garcia *et al.* (1997) demonstraram que o extrato metanólico das partes aéreas de *Achillea ageratum* possui propriedades analgésicas e antipiréticas, em diversos modelos experimentais, sendo que a investigação fitoquímica do extrato revelou a presença de compostos polifenólicos, sugerindo que os flavonóides seriam os responsáveis por estes efeitos. Já, no óleo essencial os responsáveis pelas propriedades analgésicas seriam os derivados do ácido salicílico, eugenol e mentol. Os taninos, esteróis, triterpenos e substâncias do óleo volátil, como cânfora, azuleno, sesquiterpenos e mentol possuem atividade anti-inflamatória e flavonóides com atividade antiespasmódica (CHANDLER, 1989).

As flavonas, isoladas das partes aéreas de *A. atrata* L *multifida*, parecem possuir atividade antimicrobiana *in vitro* (ALJANCIC *et al.*, 1999). Dois flavonóides, casticina (HAIDARA *et al.*, 2006) e centaureidina (TRIFUNOVIC *et al.*, 2006), respectivamente derivados de *A. millefolium* L e *A. clavennae*, mostraram exercer atividade citotóxica. Além disso, os resultados de um estudo *in vitro*, mostraram que os flavonóides presentes no extrato de *A. millefolium* L exibiam atividade estrogênica (INNOCENTI *et al.*, 2007; TAKZAREE *et al.*, 2008).

Estudos pré-clínicos corroboram com os dados anteriores da literatura em relação aos efeitos antinociceptivo e antiulcerogênico do extrato bruto de *A. millefolium* L (DALSENTER *et al.*, 2004; CAVALCANTI *et al.*, 2006; PIRES *et al.*, 2009). O extrato aquoso de *A. millefolium* L apresentou atividade antiulcerogênica, em ratos Wistar, submetidos a diferentes modelos de indução de lesões gástricas

I. Introdução

(etanol, indometacina e ácido acético), sem sinais importantes de toxicidade mesmo submetendo-se a exposições durante 90 dias (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

O pré-tratamento dos animais com extrato bruto de *A. millefolium* L reduziu a taxa de mortalidade para 40% em ratos que receberam LPS e d-GaIN, apresentando o efeito hepatoprotetor contra d-galactosaminase (d-GaIN) e lipopolissacarídeo (LPS) que agem induzindo hepatite em ratos. Além disso, os aumentos plasmáticos de ALT (alanina aminotransferase) e AST (aspartato aminotransferase) foram prevenidos com a administração do extrato de *Achillea*. Também houve uma melhora na arquitetura hepática, com ausência de congestão parenquimal, diminuição de apoptose celular (YAEESH *et al.*, 2006).

Diferentes espécies do gênero *Achillea* têm sido usadas no tratamento de distúrbios gastrointestinais e hepatobiliares na medicina européia tradicional, onde em fígados de rato, o efeito colerético de frações da planta comparado com a cinarina, principal componente colerético da *Cynara scolymus* tem sido estudado. O extrato da planta estimulou um fluxo biliar mais eficientemente que o simples composto cinarina (BENEDEK *et al.*, 2005).

1.2.7. Toxicologia

A. millefolium L é considerada uma planta de baixa toxicidade, classificada como de uso seguro (DUKE, 1987) e aprovada pela Food and Drug Association (FDA) para uso em bebidas alcoólicas (BLUMENTHAL *et al.*, 2000), contribuindo assim para sua utilização pela população. Porém alguns de seus constituintes químicos são citados na literatura como potencialmente tóxicos, entre eles a cânfora, a rutina, as tujonas, o terpineol, o cineol, o formaldeído e o ácido isovalérico (DUKE, 1992).

I. Introdução

Duke (1987), ao classificar as plantas medicinais quanto ao seu potencial tóxico, considerou a mil-folhas como uma planta cujo uso é mais seguro que o café, podendo ser ingerida uma quantidade diária de três xícaras, por um adulto. TYLER, citado por Duke (1987), em seus estudos de segurança não atribuiu pontos negativos à *A. millefolium* L enquanto que Rose também citado por Duke (1987), não recomendou a ingestão superior a uma xícara de infuso ao dia, com 10 gramas da planta, classificando-a como mais perigosa que o café.

Estudos de segurança demonstraram que a administração do infuso de *A. millefolium* L em doses superiores a 3,65 g/kg (via oral) e superiores a 3,1 g/kg (via intraperitoneal), do extrato etanólico na dose de 1 g/kg (via intraperitoneal), em ratos, e do extrato aquoso bruto nas doses de 6,5 g/kg (via oral) e de 2,25 g/kg (via intraperitoneal), em camundongos, produziram mortalidade abaixo de 50% nos animais tratados (KUDRZYCKA-BIELOSZABSKA e GLOWNIAK, 1996; CÁCERES, 1999; SANSANA, 1999).

Estudos demonstraram que as doses de 10 g/kg (via oral) e 3 g/kg (via intraperitoneal) do extrato aquoso bruto das folhas de *A. millefolium* L, em ratos, produziram mortalidade abaixo de 50% nos animais tratados. Ainda a administração de uma única dose do extrato bruto aquoso ou o tratamento diário com uma dose durante 28 dias (subcrônico) ou durante 90 dias (crônico) ou ainda 30 dias após a suspensão dos tratamentos com a maior dose do extrato (1,2 g/kg, via oral), demonstraram que a *A. millefolium* L não promoveu alteração das funções hepática, renal, pancreática e hematológica de ratos machos e fêmeas (CAVALCANTI, 2002).

Estudos pré-clínicos, após 90 dias de tratamento com *A. millefolium* L, em ratos fêmeas não indicam toxicidade reprodutiva (BOSWELL-RUYS et al., 2003; DALSETER et al., 2004). Em outro experimento, o extrato de folhas não alterou o

I. Introdução

tempo do primeiro acasalamento, fertilidade e o tamanho das crias (BARNES *et al.*, 1979). Em relação à atividade contraceptiva da *A. millefolium* L, a fração água/metanol exibiu atividade estrogênica e nove componentes foram isolados entre eles o 9-O- b-d-glucopiranosídeo, isolado pela primeira vez neste gênero (MONTANARI *et al.*, 1998; INNOCENTI *et al.*, 2007).

As alcanidas, betonicina e estaquidrina, produziram uma ação uterotônica em ratas prenhas, indicando que o uso da planta não é recomendável durante a gestação (ALONSO, 1998; BLUMENTHAL *et al.*, 2000). Alonso (1998) e Cáceres (1999) relataram que tanto o uso prolongado quanto doses elevadas da planta foram relacionadas a queixas de tontura e cefaléia.

1.2.8. *Achillea millefolium* L e o Sistema Nervoso Central

Os produtos naturais têm servido de inspiração para o desenvolvimento de várias substâncias pela química orgânica nos últimos tempos. A avaliação de extratos e de compostos derivados de plantas, e que, apresentam atividade promissora, serve como caminho para o avanço de metodologias de síntese e a possibilidade de fabricação de análogos do composto original, melhorando seus aspectos farmacológicos e farmacêuticos (HARVEY, 2008), buscando sempre uma maior eficácia e menos efeitos adversos. Na última década, houve um aumento significativo na busca de novos agentes terapêuticos originados de plantas medicinais para doenças psiquiátricas (ZHANG, 2004). Isto pode ser explicado pela importância que os distúrbios mentais e neurológicos apresentam atualmente.

A prevalência mundial de distúrbios neurológicos e mentais tem preocupado a comunidade internacional. Segundo a OMS/WHO, estima-se que os transtornos mentais e neurológicos sejam responsáveis por cerca de 1% das mortes, tornando-

I. Introdução

os problemas prioritários de saúde. O prolongamento da expectativa de vida e o envelhecimento da população em geral nos países desenvolvidos e em desenvolvimento levam a um aumento na prevalência de doenças crônicas e progressivas (OMS/WHO, 2006; OMS/WHO, 2007).

As áreas terapêuticas de oncologia, cardiovascular e sistema nervoso central (SNC) representam mais de 50% do mercado total de medicamentos por indicação e 52% do mercado farmacêutico total. A área de oncologia representa 18% da quota total de mercado, a área de cardiovascular 19% e do SNC com 15% do total (GBI RESEARCH, 2010). Estes percentuais indicam que estas áreas terapêuticas irão decidir o caminho a ser seguido pela indústria farmacêutica global.

Entre as doenças do SNC, podemos citar a depressão e a ansiedade, como doenças primárias ou secundárias a outras patologias, centrais ou não. De acordo com a OMS/WHO (2007), dessas, a depressão apresenta maior destaque, uma vez que é classificada como a principal causa de incapacidade mundial e afeta aproximadamente 120 milhões de pessoas no mundo inteiro em diferentes faixas etárias.

Atualmente, o número de trabalhos científicos que estudam e comprovam o efeito ansiolítico e/ou antidepressivo de plantas medicinais utilizadas popularmente é imenso. Um grande número de plantas tradicionalmente utilizadas apresentam propriedades farmacológicas com grande potencial em aplicações terapêuticas para o SNC, tais como transtornos de ansiedade (CARLINI, 2003; FAUSTINO *et al.*, 2010). Estas plantas têm sido estudadas em uma variedade de modelos animais e ensaios neuroquímicos, resultando informações úteis para o desenvolvimento de novas farmacoterapias (SOUSA *et al.*, 2008).

I. Introdução

Poucas são as substâncias derivadas de plantas que já foram aprovadas para o uso clínico. Isso devido as complexas misturas de componentes químicos e as diversas ações biológicas e farmacológicas da maioria das plantas medicinais. Os extratos e constituintes que apresentam efeitos terapêuticos em modelos animais de doenças psiquiátricas devem ser usados na busca de novos agentes terapêuticos a partir destas plantas para esses transtornos (SOUSA *et al.*, 2005; SOUSA *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2008).

No entanto é necessário comprovar a segurança da utilização destes compostos na clínica, antes de serem utilizados em pacientes no tratamento de desordens psiquiátricas. Considerando a dificuldade do paciente à adesão terapêutica aos métodos convencionais, devido aos efeitos colaterais, que ocorrem principalmente em tratamentos de longa duração, os medicamentos derivados de plantas medicinais podem ser uma alternativa para os pacientes que apresentam condições persistentes e intolerância aos efeitos adversos. Os efeitos benéficos de plantas e seus constituintes têm sido demonstrados em estudos clínicos no tratamento de distúrbios psiquiátricos, como a ansiedade e depressão (ZHANG, 2004; SARRIS, 2007).

Na ANVISA, são encontrados registros de alguns medicamentos fitoterápicos classificados de acordo com a principal categoria terapêutica comprovada, como ansiolíticos simples como a *Valeriana officinalis*, *Piper methysticum*, *Passiflora incarnata*, *Melissa officinalis* e *Matricaria recutia*, enquanto que como antidepressivo tem-se apenas o *Hypericum perforatum* (Di CARLO *et al.*, 2001; SARRIS, 2007; CARVALHO *et al.*, 2008).

Com a inclusão, pelo Ministério da Saúde (MS), da *A. millefolium* L na lista de plantas que poderão originar fitoterápicos (Fev/2009), reforça-se ainda mais a

I. Introdução

necessidade de estudos científicos que comprovem seu uso pela população, acerca de sua eficácia e segurança (MS, 2010). Apesar da *A. millefolium* L compor a lista de plantas propostas pelo Ministério da Saúde (MS, 2010) e que poderá originar um fitoterápico para o tratamento de distúrbios do SNC, poucos dados têm sido publicados sobre esta ação farmacológica.

Reyes e Saraiva (1995) mostraram que a administração do extrato aquoso de folhas da *A. millefolium* L (750 e 1000 mg/kg de peso) diminuiu a atividade exploratória, no teste da placa perfurada, e a atividade motora dos animais no teste da barra giratória, e potencializou o tempo de sono induzido por pentobarbital em 50% dos animais, sugerindo depressão do SNC.

O óleo essencial da *A. millefolium* L diminuiu a atividade espontânea dos animais no campo aberto, inibiu as convulsões induzidas por cardiazol e prolongou o sono induzido por hexobarbital (Evipan®) nas doses de 300 a 600 mg/kg (KUDRZYCKZ-BIELOSZABSKA, GLOWNIAK, 1996).

Molina-Hernandez *et al.* (2004), empregando o teste de conflito operante, mostraram que a administração intraperitoneal do extrato aquoso das flores de *A. millefolium* L possui ação do tipo anti-conflito e que esta varia de acordo com a fase do ciclo estral em ratas. Reforçando esta sugestão de um provável efeito ansiolítico, Vafaei *et al.* (2006) mostraram que o extrato hidroalcoólico das partes aéreas de *A. millefolium* L administrado agudamente, por via intraperitoneal, exerce um efeito ansiolítico no teste do labirinto em cruz elevado. Estudos anteriores mostraram um efeito ansiolítico do extrato bruto hidroalcoólico das partes aéreas de *A. millefolium* L no modelo do labirinto em cruz elevado e no teste de esconder esferas, em camundongos (BARETTA *et al.*, 2009).

I. Introdução

A busca por novas drogas ansiolíticas é justificada pelos problemas encontrados com os atuais tratamentos para os Transtornos de Ansiedade Generalizada. Por exemplo os benzodiazepínicos (BDZ) que podem levar a efeitos colaterais, como amnésia, dependência e sedação, o que causa grande preocupação; já a buspirona, outro ansiolítico, apresenta baixa satisfação entre os pacientes; e os antidepressivos podem levar à disfunção sexual, insônia e distúrbios gastrointestinais (ANDREATINI *et al.*, 2001; CARLINI, 2003; MITTE *et al.*, 2005).

Atualmente, existem várias drogas antidepressivas disponíveis para uso clínico, que, com relação aos fármacos antidepressivos mais antigos (por exemplo, tricíclicos), mostram maior tolerabilidade e segurança. No entanto, dois grandes problemas ainda são observados: uma longa demora (2-4 semanas) para obter melhora clínica significativa e a sua eficácia limitada, uma vez que, aproximadamente, apenas 50% dos pacientes apresentam a remissão completa (BERTON, NESTLER, 2006). Além disso, os novos antidepressivos (por exemplo, fluoxetina, venlafaxina e duloxetina) ainda apresentam efeitos colaterais desagradáveis como, disfunção sexual, ou elevação da pressão arterial (PAPAKOSTAS, 2010), o que reduz a adesão do paciente ao tratamento de manutenção. Assim, novas drogas antidepressivas são necessárias. As plantas medicinais são uma fonte rica e promissora para a busca de novas drogas psicotrópicas (CARLINI, 2003) e o *Hypericum perforatum* é um bom exemplo de um produto natural para os estados depressivos (BUTTERWECK *et al.*, 1998; BUTTERWECK *et al.*, 2000; RAHIMI *et al.*, 2009).

Apesar da *A. millefolium* L ser bem conhecida na medicina tradicional brasileira, apresentando propriedades sobre diversos sistemas, poucos estudos científicos têm demonstrado a ação farmacológica relacionada ao Sistema Nervoso

I. Introdução

Central. Por isto, o objetivo deste estudo foi verificar os possíveis efeitos ansiolítico e antidepressivo da administração oral aguda e repetida do extrato bruto hidroalcolico das partes aéreas de *A. millefolium* L em diferentes modelos animais de avaliação comportamental.

A hipótese deste trabalho foi que o extrato bruto hidroalcólico obtido das partes aéreas de *Achillea millefolium* L pode apresentar atividade ansiolítica e antidepressiva em diferentes modelos animais. Se esta hipótese for verdadeira, será justificada a continuidade de estudos para corroborar ou não o uso popular em distúrbios do sistema nervoso central e a *A. millefolium* L e poderá ser incluída na lista de plantas promissoras para novos produtos nesta área terapêutica.

3.1 Objetivo Geral

- Investigar o efeito do extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *A. millefolium* L em diferentes modelos animais, para avaliação de medicamentos ansiolíticos e antidepressivos.

3.2 Objetivos Específicos

- Realizar análise fitoquímica qualitativa do extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *A. millefolium* L.
- Realizar a triagem farmacológica experimental com o extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *A. millefolium* L.
- Verificar se o tratamento agudo e repetido (25 dias) com o extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *A. millefolium* L apresenta efeito tipo ansiolítico.
- Verificar se o tratamento agudo com os flavonóides: apigenina e rutina (*A. millefolium* L) e naringenina apresentam efeito tipo ansiolítico.
- Verificar a participação da transmissão GABA/BZD com o uso da picrotoxina e do flumazenil.
- Avaliar a possível ligação do extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *A. millefolium* L em RBZD.

- Verificar se o tratamento agudo e repetido (25 dias) com o extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *A. millefolium* L apresenta efeito tipo antidepressivo.
- Avaliar o efeito do extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas de *A. millefolium* L, após tratamento repetido, sobre os níveis de monoaminas (5-HT, NA e DA) e seus metabólitos em diferentes áreas cerebrais (córtex frontal, hipocampo, amígdala e estriado).

4.1 Material Biológico

Foram utilizados camundongos machos albinos Swiss - *Mus musculus* (3 - 3,5 meses de idade) e ratos machos albinos - *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar (3 - 4 meses de idade), experimentalmente ingênuos, pesando entre 30 a 45g e 200 a 300 g, respectivamente, no período experimental. O número total de animais utilizados nestes experimentos foi de 794 camundongos e 20 ratos (para o *binding*). Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Paranaense. Os animais foram alojados em grupos de 5-6 por caixa e mantidos durante os experimentos no Biotério setorial do laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense (UNIPAR). A temperatura ambiente, $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o ciclo de luz claro/escuro de 12h (luz das 6h às 18h) foram controlados automaticamente. Os animais receberam água e ração *ad libitum*, exceto durante a realização dos experimentos. Os grupos controle e experimental (n= 10-12 para cada grupo) os animais foram randomizados em controle e grupos experimentais. As análises comportamentais descritas neste trabalho foram realizadas no período entre 8h a 13h e no dia de cada experimento os animais foram habituados às condições experimentais pelo menos 1h antes do início de cada experimento.

Para a coleta de material biológico, após o tratamento os animais foram decapitados com guilhotina e o cérebro dissecado e armazenado em temperatura de -40°C até o dia das análises. Enquanto que os demais animais foram submetidos à eutanásia logo ao termino dos testes comportamentais.

Para eutanásia foi utilizada a dose letal de Tiopental (150mg/kg), administrado intraperitoneal, conforme estabelece a Resolução N^o 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, em seguida os animais

foram acondicionados em sacos plásticos, mantidos em congelador próprio presente no laboratório de Farmacologia e recolhido pelos responsáveis do lixo hospitalar e conduzidos ao destino, conforme protocolo do Comitê de Biossegurança da UNIPAR. O presente projeto foi desenvolvido de acordo com as normas legais de experimentação animal (Lei Arouca - nº 11.794, de 8 de outubro de 2008) e, antes de seu início foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIPAR, sendo executado somente após sua aprovação sob número de autorização 13.911, conforme apresentado no Anexo I.

4.2 Material Botânico

A. millefolium L utilizada nestes experimentos foi coletada em julho de 2007 no Horto Medicinal (Figuras 2 e 3) da Universidade Paranaense (UNIPAR) Unidade Universitária de Umuarama (Brasil), a 430 m de altitude acima do nível do mar (S23°47'55 – W53°18'48). A área para cultivo e as plantas matrizes de *A. millefolium* L foram selecionadas e coordenadas pela Prof^a Dra. Ezilda Jacomassi (UNIPAR). O material vegetal (partes aéreas isentas de inflorescência) foi seco em estufa com circulação forçada de ar à 40°C por quatro dias. Após a secagem, o material foi submetido à trituração. A pulverização foi realizada em trituradores industriais, em seguida, o material foi acondicionado em saco duplo, de polietileno na parte interna e de papel Kraft na parte externa, até o preparo do extrato bruto.

Uma amostra da planta foi coletada, preparada e identificada pela Dra. Mariza Barion Romagnolo (Departamento de Botânica, UNIPAR/UEM). Esta exsicata encontra-se registrada no Herbário da Universidade Paranaense (UNIPAR) Unidade Universitária de Paranavaí sob o N° 1896.



**Figura 2 – Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense – UNIPAR.
Foto: Diretoria de Divulgação e Cultura da UNIPAR**



**Figura 3 – Canteiros para cultivo de plantas medicinais – vista panorâmica
Foto: Diretoria de Divulgação e Cultura da UNIPAR
(Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense - UNIPAR).**

4.2.1 Preparação do extrato bruto hidroalcólico (EBHA)

O procedimento clássico para obtenção de extratos orgânicos de material vegetal seco e triturado é a extração por solventes de polaridade crescente, sendo os principais hexano, clorofórmio e etanol ou metanol (para compostos mais polares) e hexano, clorofórmio ou éter (para compostos apolares). Tais solventes devem ser preferidos ao invés da água, pois são mais facilmente evaporados e previnem o crescimento de microrganismos. Com uma extração inicial que utiliza solventes de baixa polaridade obtêm-se compostos mais lipofílicos, por outro lado com solventes alcoólicos obtêm-se um amplo espectro de material polar e apolar (MATOS, 1998; HOSTETTMANN *et al.*, 2003). Em relação à escolha do solvente, deve-se levar em consideração a toxicidade do solvente e a estabilidade das substâncias extraídas. Na Tabela 1, são listadas algumas substâncias e o tipo de solvente adequado à sua extração (MATOS, 1998).

O extrato bruto hidroalcólico de *A. millefolium* L (etanol/água 9:1), obtido a partir de álcool de cereais, foi preparado na proporção de 100g da droga vegetal pulverizada a cada 100 mL de solvente. A extração realizada por maceração à temperatura ambiente (PRISTA *et al.*, 1975), inicialmente por 48 horas e posteriormente até esgotamento. Os extratos hidroalcólicos obtidos foram filtrados e concentrados à pressão reduzida em evaporador rotatório, com temperatura entre 50-55°C. Após a eliminação do solvente orgânico, o extrato concentrado foi separado em alíquotas de 1000 mL, em frascos de cor âmbar, identificado com número de lote, data e concentração (através da determinação do peso seco), sendo conservado em congelador em temperatura média de -20°C. Uma parcela dos EBHA descongelados foi reconcentrada em rotaevaporador rotatório,

congelados em nitrogênios líquidos e liofilizados, fornecendo o EBHA com rendimento de 17,39%.

Tabela 1 - Solvente e os respectivos metabólitos secundários extraídos.

Solvente	Substâncias Extraídas
Éter de petróleo, hexano.	Lipídeos, ceras, pigmentos, furanocumarinas.
Éter etílico, diclorometano, clorofórmio.	Bases alcaloídicas livres, antraquinonas livres, terpenos, heterosídeos cardiotônicos, esteróides.
Acetato de etila, butanol.	Geninas de flavonóides, cumarinas simples, terpenos e esteróides.
Etanol e metanol.	Heterosídeos de forma geral.
Misturas hidroalcoólicas, água.	Saponinas, taninos, flavonóides, açúcares.
Água acidificada	Alcalóides.
Água alcalinizada	Saponinas.

4.2.2 Análise Fitoquímica Preliminar

Os testes fitoquímicos foram realizados segundo metodologia proposta por Mattos (1988). O EBHA de *A. millefolium* L foi testado quanto à presença de fenóis, taninos, antocianinas e antocianidinas, chalconas e auronas, alcalóides, flavonas, flavonóis e xantonas, flavononóis, leucoantocinaninas, flavanonas, flavonóides, açúcares, esteroides e triterpenóides saponinas e ácidos fixos fortes, conforme a descrição abaixo:

Uma solução contendo 25 mL do EBHA de *A. millefolium* L e 25 mL de solução com 70% de etanol e 30% de água, foi utilizada para a realização dos

testes. Separaram-se sete tubos de ensaio contendo 4 mL da solução contendo o EBHA, e foram submetidos aos seguintes testes:

Tubo 1 - Teste para fenóis e taninos: foi acrescentado ao tubo três gotas de FeCl_3 , agitou-se e foi observada a reação colorimétrica com formação de precipitados:

- azul e/ou vermelho: indica a presença de fenóis;
- azul: indica a presença de taninos pirogálicos e
- verde: indica a presença de taninos condensados.

Tubos 2, 3, 4 – Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides: foram corrigidos os valores de pH de cada tubo da seguinte maneira: tubo 2 com pH = 3; tubo 3 com pH = 8,5; e tubo 4 com pH = 11. Observou-se o aparecimento de cores conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Reações do EBHA de *A. millefolium* L para identificação de antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavononóis.

Constituintes	pH = 3	pH = 8,5	pH = 11
Antocianinas e antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul Púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	-	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelho	-	Vermelho Púrpura
Flavononóis	-	-	Vermelho Laranja

Tubos 5 e 6 – Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas: ao tubo 5 foi adicionado HCl para corrigir o pH = 3 e ao tubo 6 foi adicionado NaOH para corrigir o pH = 11. A mistura foi aquecida e foi observada a coloração, conforme a Tabela 3.

Tabela 3 – Reações do EBHA de *A. millefolium* L para identificação de leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.

Constituintes	pH = 3	pH = 11
Leucoantocianidinas	Vermelho	-
Catequinas	Pardo Amarelada	-
Flavonas	-	Vermelho Laranja

Teste para confirmação de catequinas: um palito de fósforo (na parte da madeira) foi umedecido com a solução preparada do EBHA de *A. millefolium* L. Após o solvente evaporar a madeira foi re-umedecida com HCl concentrado. Em seguida o palito foi aquecido em chama e observou-se o aparecimento de cor vermelha. Este resultado confirma a presença de catequinas.

Tubo 7 – Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonois e xantonas: ao tubo foi adicionado magnésio granulado e 0,5 mL de HCl concentrado. A cor vermelha indica a presença destas substâncias.

Determinação de extrativos %: a um béquer de vidro, com seu peso determinado, foi adicionado 10 mL da solução preparada anteriormente com o EBHA de *A. millefolium* L. Em seguida foi levado ao banho maria a 45°C até a secura, depois para uma estufa de secagem e seu peso foi determinado até a obtenção de peso constante. A partir do resíduo foi calculado o teor percentual de extrativos com relação ao peso de planta seca. Em seguida, observou-se no resíduo, com o auxílio de uma lupa, a presença de cristais que é indicativo de açúcares.

Teste para esteróides e triterpenóides: a um béquer de vidro foi adicionado 10 ml da solução preparada anteriormente com o EBHA de *A. millefolium* L que foi levado ao banho maria a 45°C até secar e posteriormente foi extraído com clorofórmio. A solução foi filtrada em funil contendo uma bolinha de algodão coberta com Na₂SO₄ anidro. Ao filtrado foi adicionado 1 mL de anidrido acético e três gotas de H₂SO₄ concentrado. A formação de coloração azul seguida de verde indica a presença de esteróides livres; a formação de coloração parda até vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.

Teste para saponinas: o resíduo insolúvel do teste anterior foi re-dissolvido em água destilada e agitado. A presença de espuma abundante e persistente indica saponinas no EBHA de *A. millefolium* L.

Teste para ácidos fixos fortes: a um béquer de vidro foi adicionado 10 mL da solução preparada anteriormente com o EBHA de *A. millefolium* L sendo adicionado 0,5 mL de etanol e 1 mL de NH₄OH concentrado, a mistura foi colocada em banho maria a 45°C até a secar. O precipitado foi re-dissolvido em água. A mistura ressuspensa foi dividida em dois frascos, um deles contendo 1 mL de NaOH 1N e no outro uma tira de papel com reagente de Nessler. A cor marrom no frasco que contém NaOH e a coloração laranja com o reagente de Nessler indicam a presença de amônia e derivados.

4.3 Drogas e Sais

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e reagentes: Cloreto de sódio (NaCl), cloridrato de imipramina (Tofranil® - Novartis Biociências S.A.), diazepam (Novaquímica Sigma Pharma), tiopental (União Química), picrotoxina (Sigma), apigenina (Sigma), rutina e naringenina (fornecidas pela Profa. Dra Cristiane H. Baggio - UFPR), flumazenil (União Química), fenobarbital (Novartis Biociências S.A.), tween 80 - polyoxyethylenesorbitan monooleate (Sigma), ácido perclórico (Sigma), metabissulfito de sódio (J.T. Baker), ácido cítrico (Merck); ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA; Sigma); ácido octanossulfônico (J.T. Baker); água de miliQ; metanol (J.T. Baker); padrões de NA, DA e 5-HT e metabólitos (Sigma); extrato bruto liofilizado de *A. millefolium* L. (fornecidos pelo Prof. Dr. Arquimedes Gasparotto Jr - UNIPAR); [³H]-Flunitrazepam 85 Ci/mmol (Perkin-Elmer, USA) (fornecidos pelo Prof. Dr. Cláudio da Cunha - UFPR); tampão Tris-HCl, sacarose, EDTA (Sigma), HEPES e proteína de membrana para a realização do ensaio de binding foram fornecidos e o protocolo foi realizado pelo Prof. Dr. Juliano Ferreira (UFSM). Os reagentes (FeCl₃, HCl – VETEC; NaOH, magnésio granulado, clorofórmio, Na₂SO₄ anidro, NH₄OH – BIOTEC; anidrido acético – VETEC; H₂SO₄, etanol – BIOTEC; tira de papel com reagente de Nessler - FITEC) para a prospecção fotoquímica foram fornecidos e o protocolo realizado pelo Prof. Dr. Euclides Lara Cardoso Jr (UNIPAR).

O extrato bruto foi diluído em água destilada contendo 2% de Tween 80, as demais drogas foram diluídas em solução salina (0,9%) estéril, assim como seus devidos controles. Todas foram administradas em volume constante de 10,0 mL/kg de peso corporal.

4.4 Modelos Experimentais

4.4.1 Triagem Farmacológica Comportamental

A triagem farmacológica, ou também conhecida como teste de Irwin ou teste hipocrático, é realizada através de observações comportamentais sistemáticas, fornecendo uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividades sobre o SNC e sistema nervoso autônomo (CUNHA *et al.*, 2009). A triagem farmacológica comportamental foi realizada com administração, via oral, do EBHA liofilizado de *A. millefolium* L nas doses de 30, 100, 300 e 600mg/kg e veículo. As doses foram escolhidas com base nos dados disponíveis na literatura. O número de animais por grupo foi de oito. As observações foram realizadas nos tempos de 0, 30, 120, 240, 360 min, 12, 24 até 96 horas após a administração, com avaliação a cada 24 horas, sempre no mesmo horário. Os parâmetros comportamentais avaliados foram: hiperatividade, agressividade, tremores, convulsões, piloereção, movimentação intensa de vibrissas, ptose palpebral, sedação, ataxia, reflexo postural, catatonia, levantar, auto-limpeza, contorções abdominais, perda de reflexos (corneal, auricular), entre outros (ALMEIDA *et al.*, 1999).

4.4.2 Avaliação da Atividade e Desempenho Motor

4.4.2.1 - Teste da Barra Giratória (rota-rod)

O aparelho é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividida em cinco compartimentos, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 rpm (Figura 4) e foi construído na oficina da UNIPAR. Os animais foram selecionados em sessões de 2 min de duração, 24h antes das administrações das preparações em estudo,

sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por, pelo menos, 1 min (MARQUES *et al.*, 2004). Os animais selecionados receberam via oral os tratamentos em estudo e foram colocados na barra giratória durante 1 min. Foram registrados o tempo de permanência na barra giratória (em segundos) e o número de quedas durante a duração do teste, que foi de um minuto (DUHAM e MYIA, 1957).



Figura 4 - Barra giratória (rota-rod) – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.2.2 - Teste de Abdução das Patas Posteriores

Após a administração oral dos diferentes tratamentos, os animais foram avaliados individualmente no teste de abdução das patas posteriores. Neste experimento, cada pata traseira dos animais foi marcada com tinta de carimbo e o animal suspenso pela cauda na posição vertical, 10 cm acima da mesa e solto em

cima de uma folha de papel (Figura 5). Esse procedimento foi repetido por três vezes. Foram consideradas como medidas, a partir do ponto central da impressão das patas traseiras, a distância entre as impressões, em cm e calculado a média entre as duas medidas subsequentes (EDWARDS e PARKER, 1977).

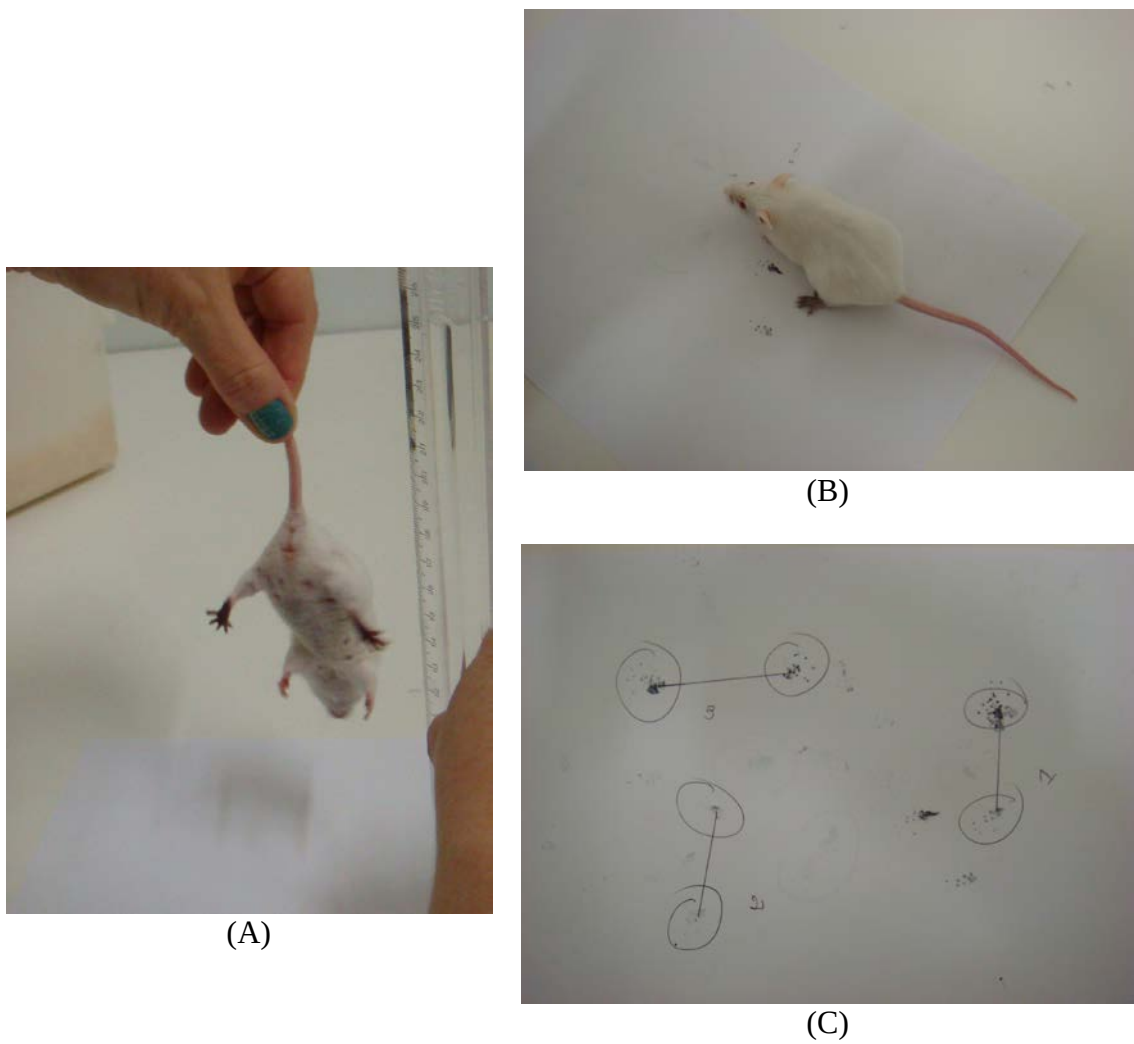


Figura 5 – Teste de Abdução das patas posteriores – (A) animal com tinta nas patas e suspenso; (B) animal solto na folha de papel; (C) impressões produzidas e pontos escolhidos para a medida do parâmetro. Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.3 - Avaliação da Atividade Exploratória e Locomotora

4.4.3.1 - Teste do Campo Aberto

O campo aberto é confeccionado em acrílico, onde suas paredes são transparentes e seu chão branco medindo 30 x 30 x 15 cm, e igualmente dividida em 20 retângulos (Figura 6) e foi construído na oficina da UNIPAR. Os animais foram avaliados no campo aberto individualmente durante cinco minutos (ARCHER, 1973), uma única vez. Os animais controles e experimentais foram avaliados intercaladamente no mesmo horário das 8h as 13h no ciclo claro. Entre as avaliações de cada animal o campo aberto foi limpo com uma solução etanólica a 10%. Os parâmetros analisados foram: locomoção, levantar, auto limpeza e duração do tempo de imobilidade. Cada locomoção significa que o animal ficou dentro de um retângulo do chão com as quatro patas, cada movimento de levantar significa que o animal ficou com somente as patas traseiras apoiadas no retângulo, com o corpo ereto perpendicularmente ao chão com a cabeça para cima tocando ou não nas paredes do campo aberto. A duração do tempo de imobilidade foi caracterizada quando o animal não apresentou atividade motora, ficando estático por algum tempo, em segundos. Os parâmetros de movimentação e levantar foram registrados, em separado, na lateral (retângulos laterais, conforme demonstrado na Figura 6) e no centro (nos seis retângulos centrais) do equipamento. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo (MONTGOMERY, 1955; BOURIN *et al.*, 2007).



Figura 6 – Campo Aberto – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.4 - Avaliação de Atividades Centrais Específicas

4.4.4.1 – Ação Ansiolítica

4.4.4.1.1 - Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O teste do labirinto em cruz elevado (LCE) de camundongos é baseado no modelo proposto por Handley & Mithani (1984) e validado por Pellow *et al.* (1985) e Lister (1990). O LCE é um dos principais testes na investigação de ansiedade (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005; PELLOW *et al.*; 1985). Ele consiste de dois braços abertos opostos (30x5cm), e dois braços fechados (30x5x25cm) também opostos, em forma de cruz grega (ou sinal de +). Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5cm). A plataforma, as paredes laterais dos braços fechados e o chão são confeccionados em acrílico e foi construído na oficina da UNIPAR (Figura 7). O aparelho está elevado a uma altura de 45 cm do nível do chão, e fica localizado em uma sala com luz vermelha (15 W).

Após o teste de cada animal, o LCE foi limpo com solução de etanol 10%. Após os tratamentos, os camundongos foram colocados no LCE, no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento observado por 5 minutos (PELLOW *et al.*, 1985). As medidas comportamentais registradas no LCE foram: frequência de entrada e o tempo despendido nos braços abertos e fechados. A frequência total de entrada é obtida pela soma simples das frequências de entradas nos braços abertos e fechados. Para análise estatística dos dados e confecções dos gráficos, a percentagem de entrada nos braços abertos foi calculada dividindo-se a frequência de entrada nos braços abertos pela frequência total de entrada, e esses índices multiplicados por 100. De maneira semelhante foi calculada a percentagem do tempo em que os animais permaneceram nos braços aberto em relação ao somatório do tempo de permanência nos braços abertos e fechados, sendo o quociente obtido multiplicado por 100. Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos revela um efeito ansiolítico (PELLOW *et al.*, 1985,1986).



Figura 7 – Labirinto em Cruz Elevado – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.4.1.2 - Teste de Esconder Esferas

Animais tratados com o extrato, droga padrão e solução controle, pelas mesmas vias e nos mesmos volumes, foram colocados em caixas de acrílico transparente com serragem e 25 bolinhas de vidro distribuídas nas laterais da caixa, equidistantes entre si e na superfície da forração (Figura 8). Ao término de 30 minutos, foi registrado o número de bolinhas de vidro escondidas pelos animais durante a vigência do teste, sob diversos tratamentos (BROEKKAMP *et al.*, 1986; NJUNG'E e HANDLEY, 1991). Drogas ansiolíticas reduzem ou suprimem esse comportamento (TREIT *et al.*, 1981).

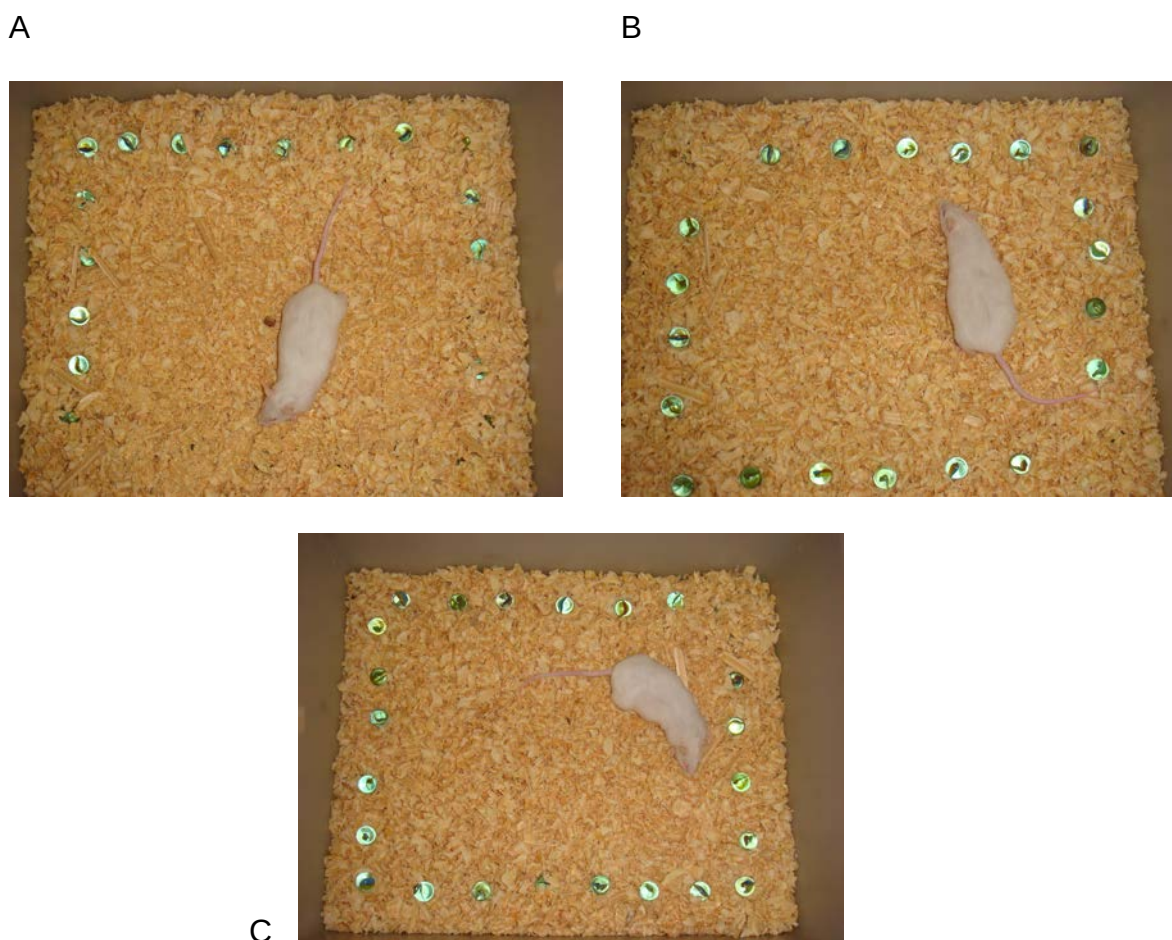


Figura 8 – Teste de Esconder Esferas: (A) Controle; (B) EBHA de *A. millefolium* L; (C) diazepam – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.4.1.3 - Teste de Neofobia ou Hipofagia Emocional

Animais privados de alimentação por 16h foram tratados com o extrato, droga padrão e solução controle, pelas mesmas vias e nos mesmos volumes. Após isto foram colocados, individualmente, em gaiolas plásticas (27x13x16cm) contendo um recipiente com uma quantidade fixa pré-pesada de sua ração habitual (Figura 9). Após 30 minutos, foi avaliada a quantidade de ração que o animal ingeriu pela repesagem. Drogas ansiolíticas aumentam a quantidade de alimento ingerida nesse paradigma experimental (SOUBRIÉ *et al.*, 1975).



Figura 9 – Teste da Neofobia ou Hipofagia emocional – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.4.1.4 - Teste da Placa Perfurada (hole-board)

Após tratamento prévio com as substâncias experimentais, os animais foram avaliados individualmente no teste do “hole-board” (placa perfurada). Este equipamento consiste de uma plataforma (50x50x30 cm) com 16 orifícios (2 cm de diâmetro) distribuídos igualmente na superfície (Figura 10) e foi construído na oficina da UNIPAR. Os animais foram colocados no centro do aparelho e, foi

registrado, durante 5 minutos, a atividade locomotora dos animais contando o número de cruzamento entre as diferentes áreas demarcadas, além dos comportamentos de levantar e auto-limpeza. Foi registrado ainda o número de vezes que os animais espreitam a cabeça nos orifícios até o nível das orelhas para avaliação de possível ação ansiolítica/ansiogênica das drogas em estudo (TREIT *et al.*, 1981).

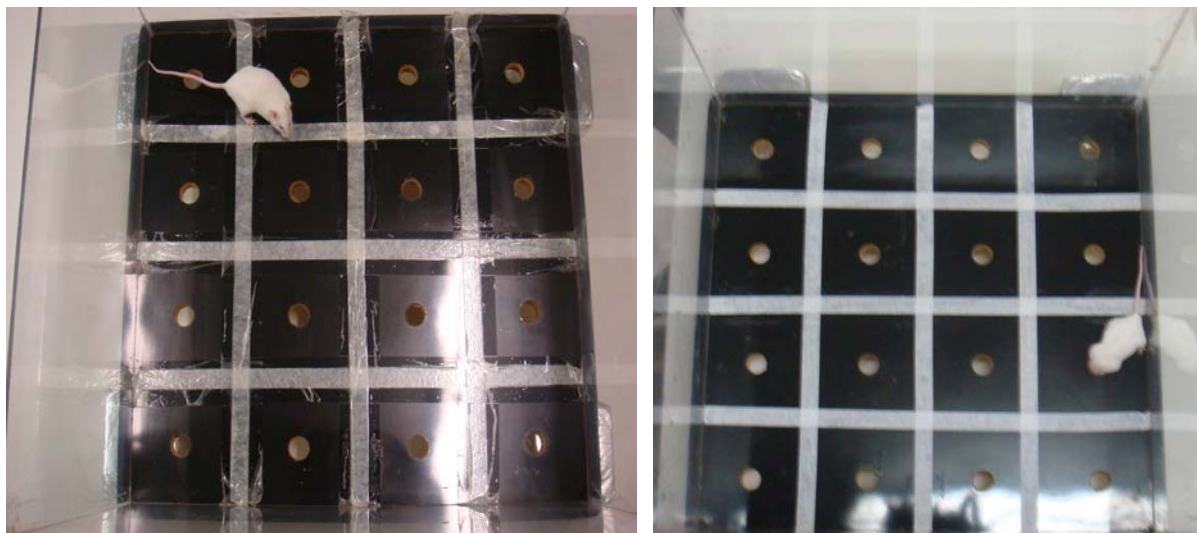


Figura 10 – Placa Perfurada – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.4.2 - Ação Antidepressiva

4.4.4.2.1 - Teste de Suspensão pela Cauda

O teste de suspensão pela cauda é um teste derivado do teste do nado forçado, sendo um procedimento bastante utilizado para avaliação e identificação de novos compostos com possível ação antidepressiva (BOURIN *et al.*, 2005; CRYAN *et al.*, 2005).

Animais pré-tratados foram suspensos pela cauda, presos com fita adesiva na lateral da bancada (Figura 11) por um período de 6 min, no qual foi registrado o tempo total de imobilidade para cada animal, além da latência para apresentação de tal comportamento, a partir do terceiro minuto. Os antidepressivos aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (STERU *et al.*, 1985; CRYAN *et al.*, 2005).



Figura 11 – Teste de Suspensão pela Cauda – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.4.4.2.2 - Teste de Natação Forçada

Os animais foram tratados com as diferentes preparações em estudo e submetidos ao teste proposto por Porsolt *et al.* (1977) para avaliar uma possível ação antidepressiva. Neste teste, os animais foram colocados individualmente, em cubas de vidro (altura=40,5 cm; largura= 23,2 cm; extensão = 40,7 cm), e foi

construído na oficina da UNIPAR, contendo 14,5 cm de água (Figura 12), por um período de 6 min, no qual foi registrado o tempo de imobilidade para cada animal, além da latência para apresentação de tal comportamento, a partir do terceiro minuto. Considera-se como imobilidade quando o animal faz apenas os movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água (PORSOLT *et al.*, 1990). Os antidepressivos aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais (PORSOLT *et al.*, 1977; BORSINI e MELI, 1988; SKALISZ *et al.*, 2004).

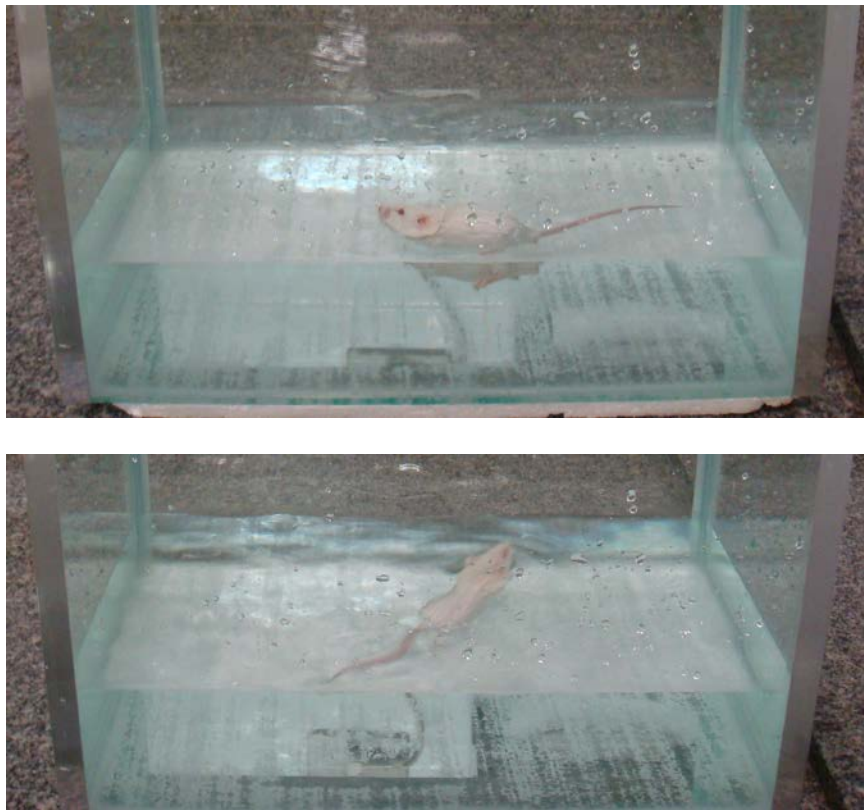


Figura 12 – Teste de Natação Forçada – Laboratório de Farmacologia da Universidade Paranaense – UNIPAR. Foto: Irinéia Paulina Baretta.

4.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.5.1 - Tratamento Agudo

Todos os testes agudos foram realizados entre as 8h e 13h, com administração, oral ou intraperitoneal, conforme indicado abaixo. Os testes da barra giratória, abdução de patas posteriores e hipofagia emocional foram realizados sequencialmente com os mesmos animais. Da mesma forma foi realizado o teste do campo aberto seguido do labirinto em cruz elevado para um outro grupo de animais. Também em sequência foi realizado o teste da placa perfurada seguido da suspensão pela cauda. Os demais testes foram realizados isoladamente.

4.5.1.1 – Avaliação da administração do EBHA de *A. millefolium* L nas atividades exploratória, motora e ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.

Para avaliar as atividades exploratória, motora e ansiolítica os animais foram habituados às condições experimentais durante 1h antes do início dos experimentos com livre acesso a água e comida. Foi realizada a administração, via oral, do EBHA liofilizado de *A. millefolium* L, resuspendido em veículo aquoso (água contendo 2% de tween 80), nas doses de 30, 100, 300 e 600 mg/kg; de diazepam (0,75 mg/kg; GAVIOLI *et al.*, 2008) ou veículo, num volume de 10 mL/kg de peso corporal. Após os tratamentos os animais foram mantidos em restrição de comida e água. Para estes protocolos os animais foram divididos nos grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I – seis grupos de camundongos (n= 10) foram conduzidos, 1h após o tratamento, aos testes da barra giratória, abdução de patas posteriores e hipofagia emocional, sequencialmente (Figura 13). Os animais foram avaliados durante 1 minuto na barra giratória, em seguida foram submetidos ao teste da abdução de patas posteriores, com duração aproximada de 1 minuto e finalmente avaliados durante 30 minutos no teste da hipofagia emocional.

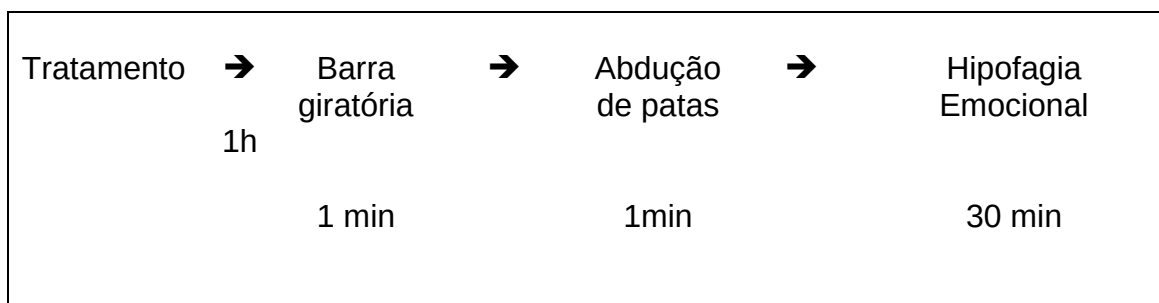


Figura 13 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade motora, nos testes da barra giratória e abdução das patas posteriores; e a atividade ansiolítica na hipofagia emocional após administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L.

Grupo experimental II - seis grupos de camundongos (n=12) foram conduzidos, 1h após o tratamento, aos testes do campo aberto seguido do teste do labirinto em cruz elevado (Figura 14). No teste do campo aberto os animais foram avaliados durante 5 minutos, em seguida submetidos a avaliação no teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos. Após o teste de cada animal, o campo aberto e o labirinto em cruz elevado foram limpos com solução de etanol 10%.

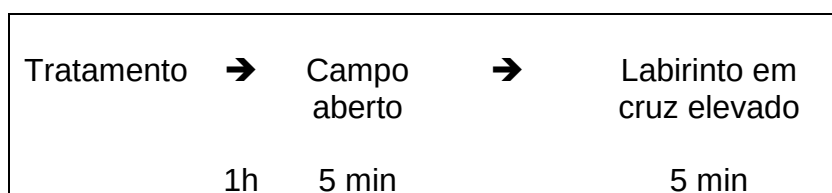


Figura 14 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar as atividades exploratória e ansiolítica nos testes de campo aberto e LCE após administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L.

Grupo experimental III - seis grupos de camundongos (n=12) foram conduzidos, 1h após o tratamento, ao teste de esconder esferas e avaliados após 30 minutos (Figura 15). Após o teste de cada animal, o cepilho e a caixa foram trocados e as bolinhas lavadas em solução de etanol a 10%.

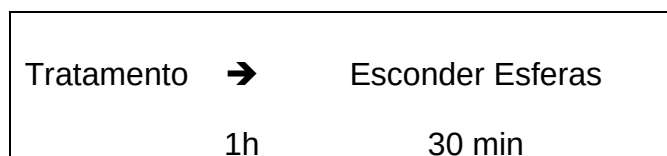


Figura 15 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade ansiolítica no teste de esconder esferas após administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L.

4.5.1.2 – Avaliação da administração de Apigenina, Rutina e Naringenina nas atividades exploratória, motora e ansiolítica em camundongos, em diferentes modelos animais.

Para avaliar as atividades exploratória, motora e ansiolítica os animais foram habituados às condições experimentais durante 1h antes do início dos experimentos com livre acesso a água e comida. Foi realizada a administração, via oral, do EBHA liofilizado de *A. millefolium* L, resuspendido em veículo aquoso (água

contendo 2% de tween 80), nas doses de 30 e 300 mg/kg; de apigenina nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg; de rutina nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg; de naringenina nas doses de 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg; de diazepam (0,75 mg/kg; GAVIOLI *et al.*, 2008) ou veículo, num volume de 10mL/kg de peso corporal. Após os tratamentos os animais foram mantidos em restrição de comida e água. Para estes protocolos os animais foram divididos nos grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I – treze grupos de camundongos (n=8-10) foram conduzidos, 15 min após o tratamento, aos testes de barra giratória, abdução de patas posteriores e hipofagia emocional, sequencialmente (Figura 16). Os animais foram submetidos ao teste da abdução de patas posteriores, com duração aproximada de 1 minuto e avaliados durante 30 minutos no teste da hipofagia emocional.

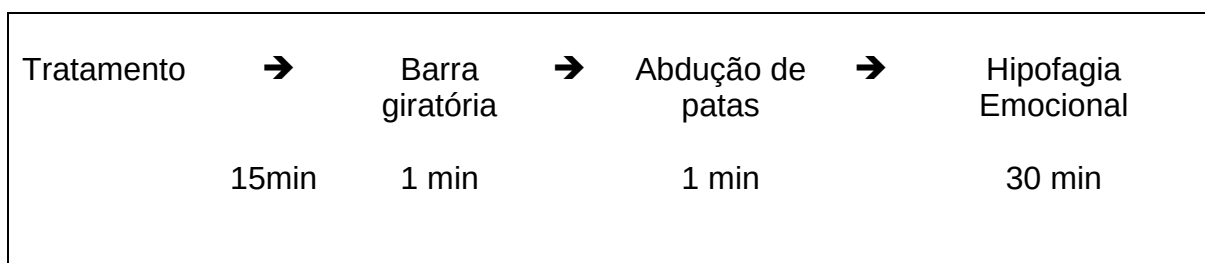


Figura 16 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade motora, nos testes da barra giratória e abdução das patas posteriores; e a atividade ansiolítica na hipofagia emocional após administração aguda dos flavonóides apigenina, rutina e naringenina.

Grupo experimental II - treze grupos de camundongos (n=8-10) foram conduzidos, 15 min após o tratamento, aos testes da placa perfurada seguido do teste do labirinto em cruz elevado (Figura 17). No teste da placa perfurada os animais foram avaliados durante 5 minutos, em seguida submetidos a avaliação no

teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos. Após o teste de cada animal, a placa perfurada e o labirinto em cruz elevado foram limpos com solução de etanol 10%.

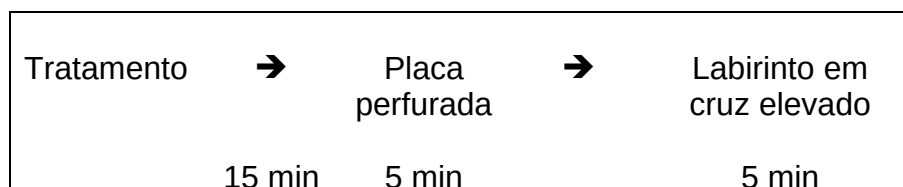


Figura 17 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar as atividades exploratória e ansiolítica nos testes da placa perfurada e LCE após administração após administração aguda dos flavonóides apigenina, rutina e naringenina.

Grupo experimental III - treze grupos de camundongos (n=8-10) foram conduzidos, 15 min após o tratamento, ao teste de esconder esferas e avaliados durante 30 minutos (Figura 18). Após o teste de cada animal, o cepilho e a caixa foram trocados e as bolinhas lavadas em solução de etanol a 10%.

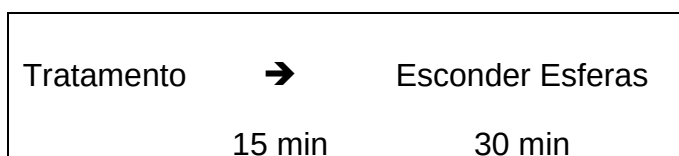


Figura 18 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade ansiolítica no teste de esconder esferas após administração aguda após administração aguda dos flavonóides apigenina, rutina e naringenina.

4.5.1.3 – Influência da administração prévia com picrotoxina ou flumazenil na atividade motora e na ação ansiolítica do EBHA de *A. millefolium* L em camundongos em diferentes modelos animais.

Para avaliar o efeito do tratamento prévio com picrotoxina ou flumazenil sobre o efeito tipo ansiolítico do EBHA de *A. millefolium* L foi realizada a administração, via intraperitoneal, de flumazenil (1,0 mg/kg, KAMEI *et al.*, 2009), ou de picrotoxina (1,0 mg/kg, STANKEVICIUS *et al.*, 2008). Após 30 minutos, foi administrado, via oral, EBHA de *A. millefolium* L, resuspendido em veículo aquoso (água contendo 2% de Tween 80), na dose de 300 mg/kg ou veículo, num volume de 10 ml/kg de peso corporal (Figura 19 A). Para estes protocolos os animais foram divididos nos grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I - seis grupos de camundongos (n=12) foram conduzidos, 1h após administração oral, aos testes do campo aberto seguido do teste do labirinto em cruz elevado (Figura 19 B). No teste do campo aberto os animais foram avaliados durante 5 minutos, em seguida submetidos a avaliação no teste do labirinto em cruz elevado, durante 5 minutos. Após o teste de cada animal, o campo aberto e o labirinto em cruz elevado foram limpos com solução de etanol 10%. Os seis grupos experimentais formados foram:

A

Grupos experimentais	Pré-tratamento (i.p)	Tratamento (v.o)
	Veículo	Veículo
	Veículo	<i>A. millefolium</i> L
	Flumazenil	Veículo
	Flumazenil	<i>A. millefolium</i> L
	Picrotoxina	Veículo
	Picrotoxina	<i>A. millefolium</i> L

B

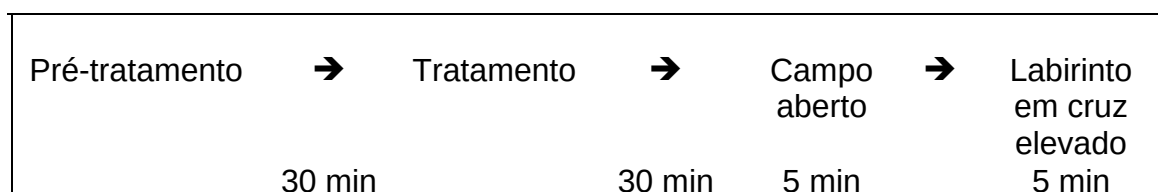


Figura 19 – Grupos experimentais (A) e desenho experimental seguido no experimento para avaliar as atividades exploratória e ansiolítica nos testes de campo aberto e LCE após administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L e tratamento prévio com flumazenil ou picrotoxina (B).

4.5.1.4 – Avaliação da administração do EBHA de *A. millefolium* L na atividade locomotora e na ação antidepressiva em camundongos em diferentes modelos animais.

Para avaliar a atividade locomotora e antidepressiva foi administrado, via oral, o extrato bruto hidroalcoólico liofilizado obtido de *A. millefolium* L, resuspendido em veículo aquoso (água contendo 2% de tween 80), nas doses de 30 e 300 mg/kg; de diazepam (0,75 mg/kg), de imipramina (10 mg/kg; XU *et al.*, 2005) ou veículo, num volume de 10 ml/kg de peso corporal. Para estes protocolos os animais foram divididos nos grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I - cinco grupos de camundongos (n=10) foram conduzidos, 1h após o tratamento, aos testes da placa perfurada durante cinco

minutos, em seguida foram avaliados no teste de suspensão pela cauda por seis minutos (Figura 20). Após o teste de cada animal, a placa perfurada foi limpa com solução de etanol 10%.

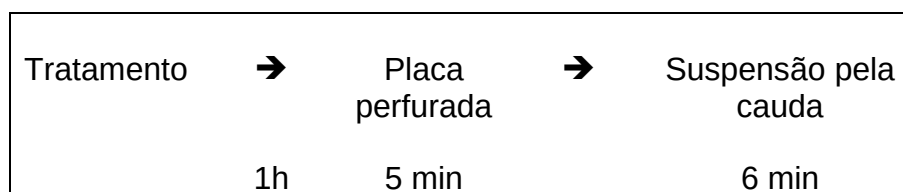


Figura 20 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar as atividades exploratória e antidepressiva nos testes da placa perfurada e suspensão pela cauda após administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L.

Grupo experimental II - cinco grupos de camundongos (n=10) foram avaliados, 1h após o tratamento, durante seis minutos, no teste de natação forçada (Figura 21). Após o teste de cada animal, a água utilizada para a natação forçada foi trocada e o aquário foi limpo com solução de etanol 10%.

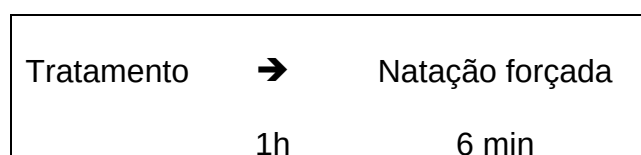


Figura 21 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade antidepressiva no teste da natação forçada após administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L.

4.5.2 - Tratamento Repetido

Todos os testes foram realizados entre as 8h e 13h, após a administração, oral ou intraperitoneal, por um período de 25 dias de tratamento, conforme indicado abaixo. Os testes da barra giratória, abdução de patas posteriores e hipofagia emocional (Figura 22) foram realizados sequencialmente com os mesmos animais. Da mesma forma foi realizado o teste do campo aberto seguido do labirinto em cruz

elevado para um outro grupo de animais (Figura 23). Também em sequência foi realizado o teste da placa perfurada seguido da suspensão pela cauda (Figura 25). Os demais testes foram realizados isoladamente.

4.5.2.1 – Avaliação da administração do EBHA de *A. millefolium* L, durante 25 dias, nas atividades exploratória, motora e ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.

Para avaliar as atividades exploratória, motora e ansiolítica os animais foram habituados às condições experimentais durante 1 h antes do início dos experimentos com livre acesso a água e comida. No último dia de tratamento (25º dia), após a administração dos tratamentos até a hora dos experimentos, os animais foram mantidos em restrição de comida e água. Foi realizada a administração diária (mesmo horário), via oral, durante 25 dias, do EBHA de *A. millefolium* L, resuspendido em veículo aquoso (água contendo 2% de tween 80), nas doses de 30 e 300 mg/kg; de diazepam (0,75 mg/kg), de imipramina (10 mg/kg), ou veículo, num volume de 1,0 ml/100g de peso corporal. Os animais foram divididos nos grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I – cinco grupos de camundongos (n= 10) foram conduzidos, 1h após a administração no último dia de tratamento, aos testes da barra giratória, abdução de patas posteriores e hipofagia emocional, sequencialmente (Figura 22). Os animais foram avaliados durante 1 minuto na barra giratória, em seguida foram submetidos ao teste da abdução de patas posteriores, com duração aproximada de 1 minuto e finalmente avaliados, durante 30 minutos, no teste de hipofagia emocional.

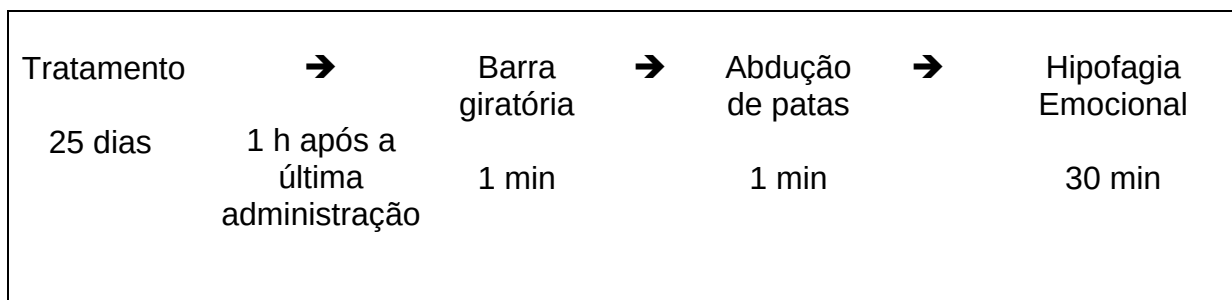


Figura 22 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade motora, nos testes da barra giratória e abdução das patas posteriores; e a atividade ansiolítica na hipofagia emocional após administração repetida do EBHA de *A. millefolium* L.

Grupo experimental II - cinco grupos de camundongos (n= 10) foram conduzidos, 1h após a administração no último dia de tratamento, aos testes do campo aberto seguido do teste do labirinto em cruz elevado (Figura 23). No teste do campo aberto os animais foram avaliados durante 5 minutos, em seguida submetidos a avaliação no teste do labirinto em cruz elevado, durante cinco minutos. Após o teste de cada animal, o campo aberto e o labirinto em cruz elevado foram limpos com solução de etanol 10%.

Grupo experimental III - cinco grupos de camundongos (n= 10) foram conduzidos, 1h após a administração no último dia de tratamento, ao teste de esconder esferas e avaliados durante 30 minutos (Figura 24). Após o teste de cada animal, o cepilho e a caixa foram trocados e as bolinhas lavadas em solução de etanol a 10%.

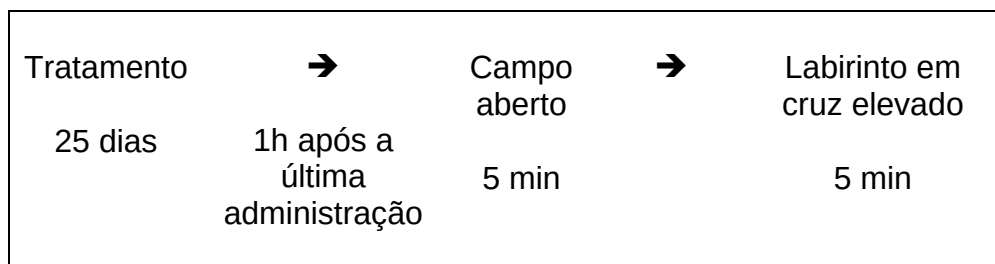


Figura 23 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar as atividades exploratória e ansiolítica nos testes de campo aberto e LCE após administração repetida com o EBHA de *A. millefolium* L.

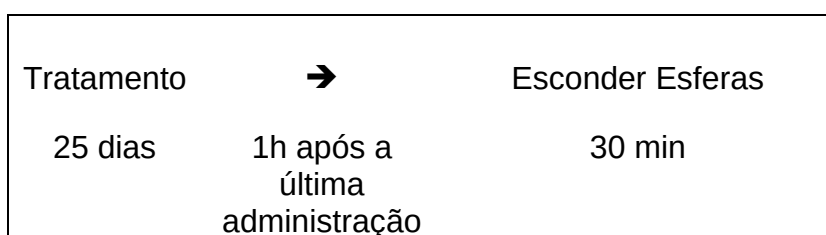


Figura 24 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade ansiolítica no teste de esconder esferas após administração repetida com o EBHA de *A. millefolium* L.

4.5.2.2 - Administração oral, durante 25 dias, do EBHA de *A. millefolium* L e a atividade locomotora e antidepressiva de camundongos em diferentes modelos animais.

Para avaliar a atividade locomotora e antidepressiva foi realizada a administração diária (mesmo horário), via oral, durante 25 dias, do EBHA liofilizado de *A. millefolium* L, resuspendido em veículo aquoso (água contendo 2% de tween 80), nas doses de 30 e 300 mg/kg; de diazepam (0,75 mg/kg), de imipramina (10 mg/kg), ou veículo, num volume de 1,0 ml/kg de peso corporal. Os animais foram divididos nos grupos experimentais da maneira que se segue:

Grupo experimental I - cinco grupos de camundongos (n=10) foram conduzidos, 1h após a administração no último dia de tratamento, aos testes da placa perfurada durante cinco minutos, em seguida foram avaliados no teste de suspensão pela cauda por seis minutos (Figura 25). Após o teste de cada animal, a placa perfurada foi limpa com solução de etanol 10%.

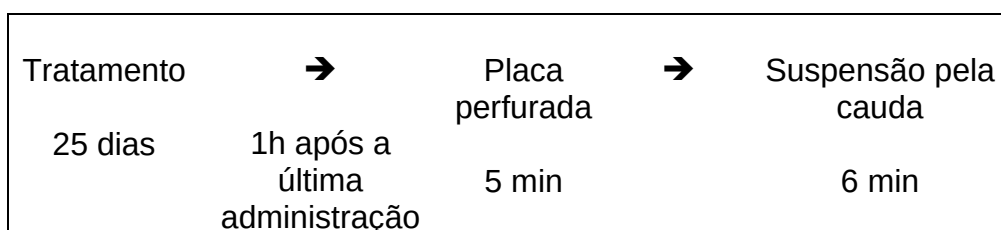


Figura 25 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar as atividades exploratória e antidepressiva nos testes da placa perfurada e suspensão pela cauda após administração repetida com o EBHA de *A. millefolium* L.

Grupo experimental II - cinco grupos de camundongos (n=10) foram avaliados, 1h após o tratamento, durante seis minutos, no teste de natação forçada (Figura 26). Após o teste de cada animal a água utilizada para a natação forçada foi trocada e o aquário foi limpo com solução de etanol 10%.

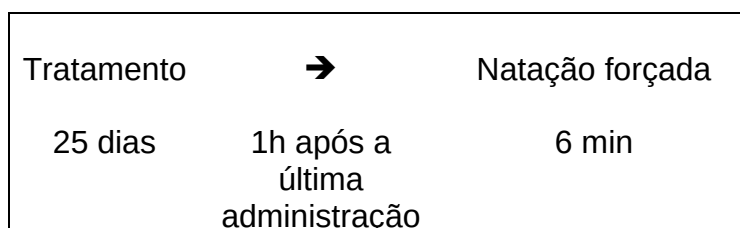


Figura 26 – Desenho experimental seguido no experimento para avaliar a atividade antidepressiva no teste da natação forçada após administração repetida com o EBHA de *A. millefolium* L.

4.6. - Binding de Receptor Benzodiazepínico

4.6.1 - Preparação das Membranas

Para a preparação da membrana, o cérebro (sem cerebelo) de ratos foi homogeneizado (1:20 v/v) em solução tampão (Tris-HCl 10 mM, sacarose 300 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4). O homogeneizado foi centrifugado a 4°C a 1.000g por 10 min e o sobrenadante foi coletado a partir desta centrifugação inicial e novamente centrifugado a 4°C a 16.000g por 20 min. O sedimento foi ressuspensão no mesmo tampão e congelado a -20°C por 48h. Após este período, as membranas foram descongeladas, ressuspensas (1:20, v/v) em Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM (pH 7,4) e centrifugados a 4°C a 13.000g por 10 min e o precipitado foi ressuspensão em mesmo tampão e centrifugado novamente. O sedimento foi ressuspensão mais uma vez e incubado a 37°C por 30 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas e lavadas nas mesmas condições descritas anteriormente por mais duas vezes. Após a última centrifugação, os pellets foram ressuspensos em HEPES 20 mM, EDTA 1 mM (pH 7,4) e o teor de proteínas foi determinada de acordo com Bradford (1976).

4.6.2 – Ensaio de Binding

O ensaio de binding de Flunitrazepam [^3H] foi realizado conforme descrito por Vogel (2008). As amostras foram incubadas, em triplicata, em tubos policarbonados (volume total de 500 μL) contendo Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), 0,5 mg de proteína de membrana, na ausência ou presença do EBHA de *A. millefolium* L (1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$). O diazepam (10 μM) foi utilizado como controle positivo. A

incubação foi iniciada pela adição de 1 μ M de Flunitrazepam [^{3} H] (85 Ci mmol/Perkin-Elmer, EUA), e mantido em gelo por 60 min. A reação foi interrompida por filtração a vácuo e cada filtro foi lavado com 15 mL de tampão Tris-HCl 10 mM resfriado. Os filtros foram colocados individualmente em tubos de policarbonados e 1mL de líquido de cintilação foi adicionado. A radioatividade foi determinada utilizando um contador de cintilação líquida (Packard Tri-Carb 2100TR). A ligação não-específica (10-20% do total de ligação) foi determinada pela adição de diazepam 100 μ M radioativo e medida em ensaios paralelos. A ligação específica foi considerada como a diferença entre o total de ligação e ligação não-específica. Os resultados foram expressos em porcentagem de ligação específica.

4.7. Dosagens de Monoaminas e Metabólitos no encéfalo de camundongos por Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção eletroquímica (HPLC-DE)

Para a dosagem de monoaminas e metabólitos no encéfalo de camundongos, foi realizada a administração diária (mesmo horário), via oral, durante 25 dias, do EBHA liofilizado de *A. millefolium* L, resuspendido em veículo aquoso (água contendo 2% de tween 80), na dose de 300 mg/kg e de veículo em volume de 10 mL/kg de peso corporal. Imediatamente após os experimentos com administração repetida, os camundongos foram sacrificados por decapitação, os cérebros foram dissecados e as estruturas utilizadas para análise por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa com detecção eletroquímica (HPLC-DE) foram: amígdala, córtex pré-frontal, estriado e hipocampo. Os níveis endógenos de dopamina, serotonina, noradrenalina e dos metabólitos 3,4-ácido dihidroxifenilacetico (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), ácido 5-hidroxitindolacetico (5-HIAA) e dihidroxifenilglicol

(DHPG), respectivamente, foram dosados por HPLC-DE. As amostras foram suspensas com ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de metabissulfito de sódio como antioxidante. Este material foi fragmentado com ultra-som e centrifugado a $10.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . Do sobrenadante, 20 μL foram injetados em uma estação de HPLC (Figura 27) composta por bomba LC-20AT (Shimadzu Corporation, Japão), um detector eletroquímico (ESA Coulochem III Electrochemical Detector) equipado com uma célula-guarda (ESA 5020) com um potencial de 350 mV e uma célula analítica com potenciais de oxidação de 100 mV para o primeiro eletrodo e 450 mV para o segundo eletrodo. As separações foram realizadas em uma coluna de fase reversa Fusion RP C-18 (Phenomenex, EUA), dimensões 150 x 4,6 mm, partículas de $4\mu\text{M}$, em temperatura de 25°C equipada com uma pré-coluna com dimensões de 4 x 3,0 mm (SecurityGuard Cartridges Fusion - RP). Os cromatogramas dos neurotransmissores e seus metabólitos foram integrados e analisados pelo software LC Solutions (Shimadzu).

A fase móvel utilizada para a análise era constituída de: ácido cítrico 20 g; ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) 40 mg; ácido octanossulfônico 200 mg; 900 mL água de miliQ; metanol 10 %; pH ajustado em 4,0; fluxo de 1,0 mL/min.

As áreas dos picos foram comparadas às áreas dos padrões externos dos mesmos neurotransmissores e metabólitos (SIGMA) para sua identificação e quantificação. Os resultados foram expressos como ng das aminas analisadas por massa de tecido fresco (g).



Figura 27– HPLC-DE - Laboratório Comum de Psicofarmacologia da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

4.8. Análise Estatística dos Resultados

O labirinto em cruz elevado, a placa perfurada, o teste de esconder esferas e campo aberto foram analisados pela ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Duncan, com exceção do número total de entradas nos braços do labirinto em cruz elevado e o número de bolos fecais no campo aberto, que foram analisados por Kruskal-Wallis ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn.

Os testes de natação forçada e suspensão pela cauda foram analisados pela ANOVA de uma via seguida pelo teste, para amostras independentes, seguido pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. Os dados que apresentaram variância heterogêneas, como os neuroquímicos, foram analisadas por testes não

paramétricos: Kruskal-Wallis ANOVA e, quando necessário, por teste de comparação múltipla.

A significância estatística foi estabelecida em $p \leq 0,05$. Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando o pacote de software Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

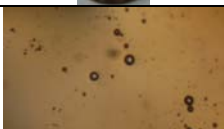
5.1 - Análise Fitoquímica Preliminar

A tabela 4 demonstra os resultados dos testes realizados para a avaliação fitoquímica preliminar dos metabólitos secundários encontrados no EBHA da planta *A. millefolium* L, com rendimento de 17,39%. Foram retiradas sujidades aparentes, e realizados testes fitoquímicos para flavonóides (flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas) e para triterpenóides (MATOS, 1988).

Tabela 4 – Avaliação fitoquímica preliminar do EBHA de *A. millefolium* L.

Constituintes	pH	EBHA AM	Reação	Fotos
Fenóis	-	-	-	
Taninos flobafênicos (condensados ou catéquicos)	-	+	Precipitado verde	
Antocianinas e antocianidinas	pH 3	-	Coloração Vermelha	
Chalconas e Auronas	pH 3	-	Coloração Vermelha	
Antocianinas e antocianidinas	pH 8,5	-	Coloração Lilás	
Antocianinas e antocianidinas	pH 11	-	Coloração Azul-púrpura	
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	pH 11	-	Coloração Amarela	
Chalconas e Auronas	pH 11	-	Coloração Vermelho-Púrpura	
Flavanonóis	pH 11	+	Coloração Vermelho-Laranja	
Leucoanto-cianidinas	pH 3	-	Coloração Vermelha	

Tabela 4 – Continuação

Catequinas (taninos catéquicos)	pH 3	+	Coloração Pardo- Amarelada	
Confirmação de catequinas (teste com palito de fósforo)	-	+	Coloração vermelha em lado acidulado do palito.	
Flavanonas	pH 11	+	Coloração Vermelho-Laranja	
Flavonóides, flavanonas, flavanonóis e xantonas	-	+	Coloração vermelha	
Açúcares e hexitóis	-	-	Ausência de cristais em lâmina	
Esteróides e triterpenóides (Lierman- Burchard)	-	-	Azul evanescente seguida de verde permanente ou vermelha	
Saponinas	-	+	Formação de espuma	
Ácidos fixos fortes	-	+	Coloração marrom no frasco que contém NaOH	

+ : resultado positivo; - : resultado negativo

Observou-se que os resultados obtidos nas reações realizadas indicam a presença de diferentes flavonóides, taninos, ácidos fixos e saponinas, semelhante ao resultado encontrado por Souza et al.. (2006) em extrato bruto etanólico de *A. millefolium* L. Enquanto que antocianinas, açúcares, esteróides e triterpenóides não

foram identificados no EBHA de *A. millefolium* L, confirmando resultados descritos na literatura (SOUZA et al., 2006; PIRES et al., 2009).

5.2 - Triagem Farmacológica Comportamental

Foi realizada, inicialmente, a triagem farmacológica comportamental com a administração de uma dose única (30, 100, 300 e 600 mg/kg, v.o.) do EBHA das partes aéreas isentas de inflorescência de *A. millefolium* L. No tratamento com dose única de 30 e 100 mg/kg, via oral, 100% dos animais tratados não apresentaram alteração comportamental durante o período de observação, em comparação aos animais tratados com o veículo.

Após 30 minutos do tratamento, 90% dos animais tratados com a dose única de 600 mg/kg do extrato apresentaram redução da atividade motora, sedação e sonolência, alterações que persistiram até a terceira hora após o início do experimento. Entre 24 e 36h após o tratamento, com a dose única de 600 mg/kg, apenas três (total = 8) animais apresentaram um discreto aumento na atividade motora e dois animais apresentaram um comportamento agressivo dirigido ao observador.

Não foram observadas alterações do diâmetro pupilar, ptose palpebral, contorções abdominais, dificuldade respiratória ou hiperemia significativa de extremidades (orelhas, cauda e patas) após a administração do extrato em estudo, em comparação com os animais tratados apenas com veículo.

Trinta e seis horas após o tratamento com o extrato, todos os animais apresentaram comportamento semelhante ao dos animais do grupo tratado com o veículo e nenhuma morte foi observada por todo o período experimental.

5.3 - Efeito da administração aguda e repetida (25 dias) via oral, com o EBHA de *A. millefolium* L na atividade motora em camundongos em diferentes modelos animais.

Como apresentado na Figura 28, o EBHA de *A. millefolium* L, nas doses de 30, 100, 300 e 600 mg/kg, administrado por via oral, aguda ou repetidamente não alterou o tempo de permanência na barra giratória (A). Já a dose de 100 mg/kg promoveu diminuição significativa ($p < 0,05$) no tempo de permanência na barra giratória após a administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L. Em relação ao número de quedas não ocorreu alteração significativa das doses de EBHA administradas, aguda ou repetidamente, quando comparados ao grupo controle. O tratamento com diazepam (DZP 0,75 mg/kg), droga sedativa padrão, reduziu significativamente o tempo de permanência na barra giratória, aguda ($F_{5,54} = 4,65$; $p < 0,05$) e repetidamente ($F_{3,36} = 11,60$; $p < 0,001$) bem como aumentou, significativamente, o número de quedas quando administrado aguda ($F_{5,54} = 3,71$; $p < 0,001$) ou repetidamente ($F_{3,36} = 5,538$; $p < 0,001$). Esses resultados mostram que o EBHA de *A. millefolium* L, administrado aguda e repetidamente, não promove alteração motora, com exceção da dose de 100 mg/kg.

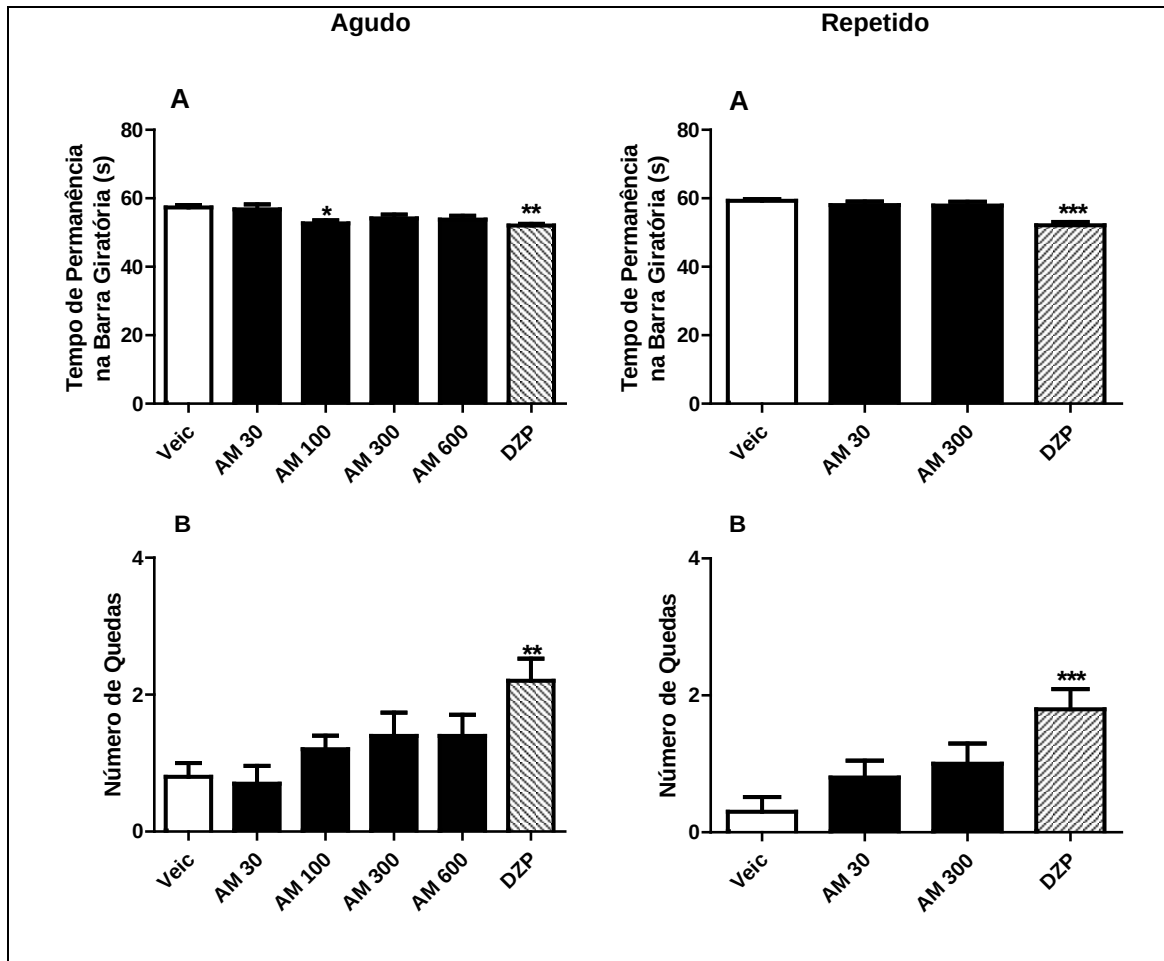


Figura 28 – Efeito da administração oral, aguda e repetida (25 dias) com o EBHA de *A. millefolium* L em camundongos nas doses de 30, 100, 300 e 600 mg/kg no teste do rota-rod: tempo de permanência na barra giratória (A) e número de quedas (B). O diazepam (DZP - 0,75 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. N = 10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (veículo).**

No teste de abdução de patas posteriores (Figura 29), que também é utilizado para avaliar a coordenação motora e efeito de relaxamento muscular, o EBHA de *A. millefolium* L, em todas as doses administradas, e o diazepam administrados agudamente promoveram aumento da distância entre as patas posteriores ($F_{5,54} = 37,85$; $p < 0,0001$). Já repetidamente (25 dias), nenhuma das doses do EBHA de *A. millefolium* L nem o diazepam promoveram incoordenação motora ($F_{3,36} = 1,85$; NS).

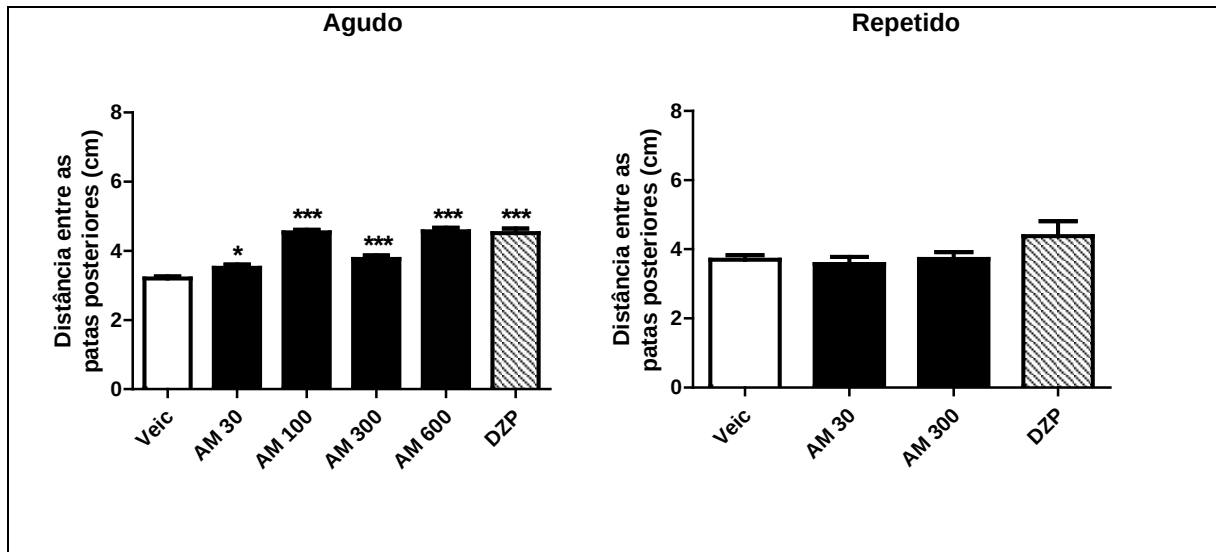


Figura 29 – Efeito da administração oral, aguda e repetida (25 dias), com o EBHA de *A. millefolium* L em camundongos nas doses de 30, 100, 300 e 600 mg/kg no teste da abdução das patas posteriores. O diazepam (DZP - 0,75 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. N = 10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ e * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.**

5.4 - Efeito da administração aguda ou repetida (25 dias) via oral, com o EBHA de *A. millefolium* L na atividade ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.

Conforme descrito nos materiais e métodos, os animais foram avaliados quanto à ação ansiolítica através dos testes de hipofagia emocional, esconder esferas e labirinto em cruz elevado. O campo aberto foi utilizado para avaliar o efeito do tratamento na atividade motora dos animais. No teste de hipofagia emocional, animais privados de alimento por 16h foram tratados, aguda e repetidamente, com o EBHA de *A. millefolium* L, em diferentes doses, em seguida a quantidade de ração ingerida foi determinada (Figura 30). A dose de 600 mg/kg de EBHA de *A. millefolium* L, após administração aguda, promoveu redução significativa ($F_{5,54} = 10,10$; $p < 0,001$) da quantidade de ração ingerida, enquanto que o diazepam

aumentou o consumo de ração ($F_{3,36} = 3,15$; $p < 0,05$). Por outro lado, a administração repetida não alterou o consumo de alimento ($F_{3,36} = 3,15$; NS).

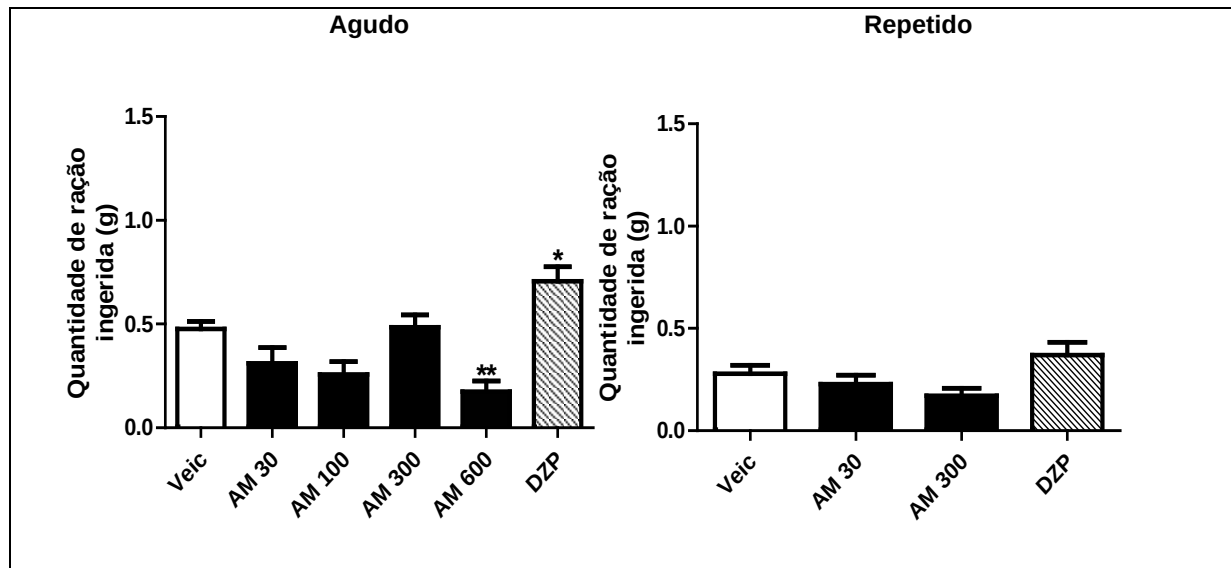


Figura 30 – Efeito da administração oral, aguda e repetida (25 dias), com o EBHA de *A. millefolium* L em camundongos nas doses de 30, 100, 300 e 600 mg/kg no teste da hipofagia emocional. O diazepam (DZP - 0,75 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. N = 10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

Os resultados referentes às medidas comportamentais registradas no labirinto em cruz elevado (LCE) são apresentados na Figura 31. As medidas comportamentais registradas no LCE de entradas e tempo despendido nos braços abertos, expressos em percentual (%) e o número total de entradas nos braços abertos e fechados do LCE, o tratamento com o EBHA de *A. millefolium* L promoveu um aumento significativo entre os grupos em relação a porcentagem de entradas nos braços abertos em ambos tratamentos agudos ($F_{5, 54} = 9,56$; $p < 0,001$) e repetido ($F_{3,36} = 18,85$; $p < 0,001$) e na porcentagem de tempo de permanência nos mesmos braços (agudo: $F_{5, 54} = 22,71$; $p < 0,001$; crônico: $F_{3, 36} = 48,93$; $p < 0,001$).

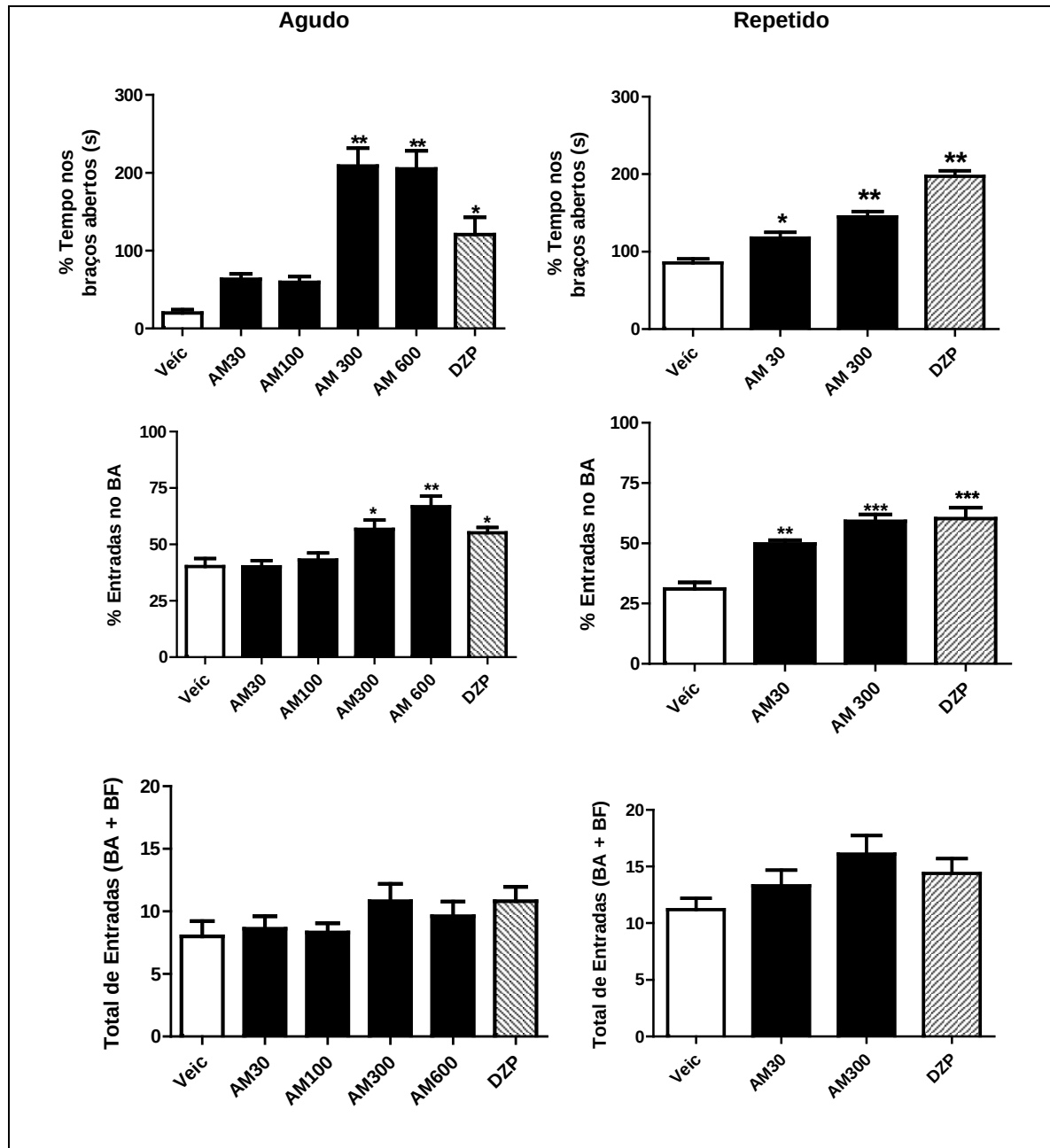


Figura 31 – Efeito da administração oral, aguda e repetida (25 dias), com o EBHA de *A. millefolium* L em camundongos nas doses de 30, 100, 300 e 600 mg/kg quanto às medidas comportamentais avaliadas em animais submetidos ao teste do LCE: frequência de tempo despendido nos braços abertos (BA); frequência de entradas nos BA, ambos expressos em porcentagem; e número total de entradas nos braços abertos e fechados. O diazepam (DZP - 0,75 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. N = 10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle.**

Nos grupos tratados agudamente, o diazepam e o EBHA de *A. millefolium* L nas doses de 300 e 600 mg/kg aumentaram a porcentagem de entradas e de tempo dispendido nos braços abertos em comparação com controle e as doses de 30 e 100 mg/kg do EBHA de *A. millefolium* L (todos com $p < 0,05$). Resultados semelhantes foram observados nos experimentos com administração repetida, onde o diazepam e o EBHA de *A. millefolium* L nas doses de 30 e 300 mg/kg aumentaram a porcentagem de entradas e o tempo dispendido nos braços abertos em comparação com o grupo controle (todos com $p < 0,01$). O número total de entradas nos braços (abertos e fechados) não apresentou quaisquer diferenças após administração aguda ($F_{5,54} = 1,20$; $p > 0,05$) ou repetida ($F_{3,36} = 2,33$; $p > 0,05$).

No teste de esconder esferas (Figura 32), observou-se reduções significativas do número de esferas escondidas após administração aguda ($F_{3,36} = 3,06$; $p < 0,05$) e repetida ($F_{3,36} = 7,52$; $p < 0,001$). A administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg e de diazepam reduziu o número das esferas escondidas quando comparados com o grupo controle (todos $p < 0,05$). A administração repetida do EBHA de *A. millefolium* L nas doses de 30 e 300 mg/kg e de diazepam também reduziram o número de esferas escondidas (todos $p < 0,01$).

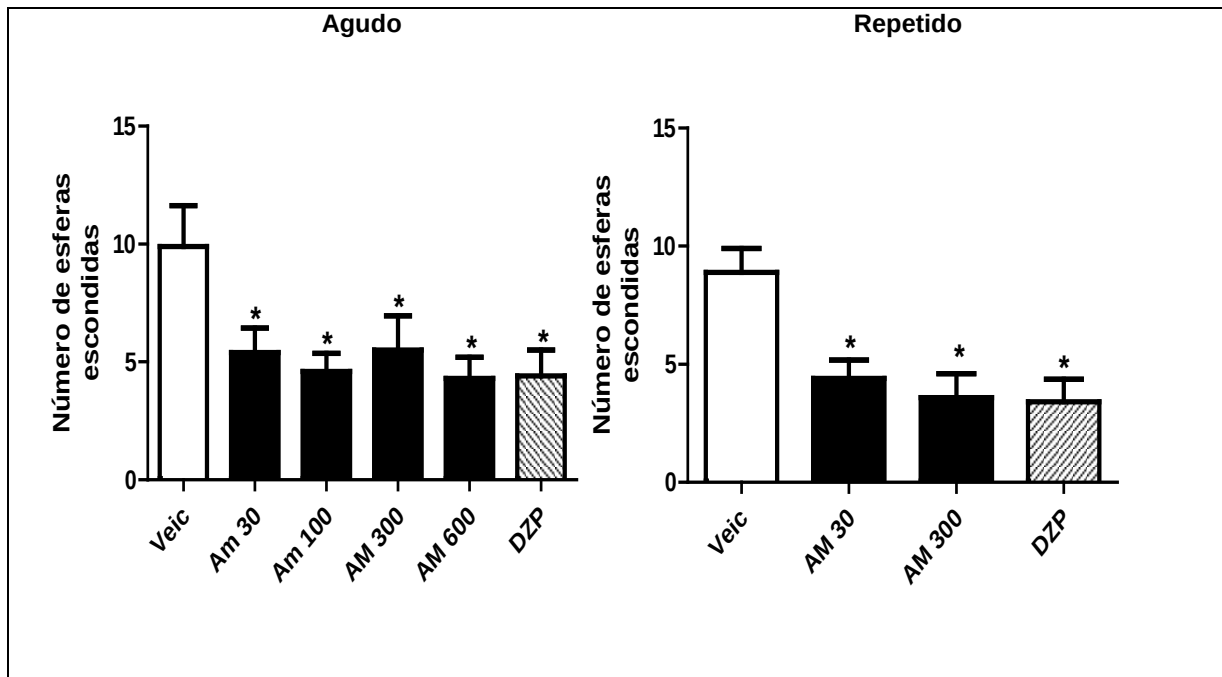


Figura 32 - Efeito da administração oral, aguda e repetida (25 dias), com o EBHA de *A. millefolium* L em camundongos nas doses de 30, 100, 300 e 600 mg/kg no teste de esconder esferas. O diazepam (DZP - 0,75 mg/kg) foi utilizado como controle positivo. N = 10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média ± e.p.m. *p<0,05 quando comparado ao grupo controle.

Os resultados referentes às medidas comportamentais registradas no campo aberto, estão representados na Tabela 5. Nenhuma diferença significativa foi observada em relação a atividade locomotora (número de cruzamentos) entre os grupos após o tratamento agudo ($F_{3,36} = 2,02$; $p > 0,05$) e repetido ($F_{3,36} = 2,73$; $p = 0,057$). Além disso, não houve diferença nos comportamentos de levantar e auto-limpeza após o tratamento agudo e repetido (todos os $F_s < 2,05$; $p > 0,10$). Nenhuma alteração ocorreu em relação ao número de bolos fecais após tratamento agudo ($H_{3,40} = 1,25$; $p > 0,05$) e repetido ($H_{3,40} = 2,54$; $p > 0,05$).

Tabela 5 – Efeitos do tratamento agudo e repetido com o EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg) e DZP (0,75 mg/kg) no teste do campo aberto.

Tratamento	Atividade Locomotora (número de cruzamentos)	Comportamento de levantar (número)	Tempo de Auto-limpeza (s)
Agudo			
Veículo	41 ± 8	8 ± 3	4 ± 1
<i>A. millefolium</i> L	57 ± 7	9 ± 3	2 ± 1
DZP	68 ± 9	7 ± 2	3 ± 1
Repetido			
Veículo	60 ± 5	17 ± 3	7 ± 1
<i>A. millefolium</i> L	68 ± 5	12 ± 2	3 ± 1
DZP	69 ± 11	15 ± 3	6 ± 2

Dados representam média ± e.p.m.; N = 10 camundongos/grupo

5.5 – Influência da administração prévia com picROTOXINA ou flumazenil na atividade motora e na ação ansiolítica do EBHA de *A. millefolium* L em camundongos em diferentes modelos animais.

A figura 33 mostra os efeitos do pré-tratamento com flumazenil (1,0 mg/kg, i.p.) ou picROTOXINA (1,0 mg/kg, i.p.) nos efeitos do diazepam (0,75 mg/kg, i.p.) em camundongos expostos ao labirinto em cruz elevado. Observaram-se diferenças significativas no % do tempo de permanência nos braços abertos ($F_{5,54} = 13,19$; $p < 0,001$), sendo que o veículo + diazepam foi estatisticamente diferente entre os demais grupos (todos com $p < 0,001$). No % de entradas nos braços abertos ($F_{5,54} = 3,53$; $p < 0,05$), da mesma forma, ocorreu diferença entre os grupos veículo + veículo e veículo + diazepam.

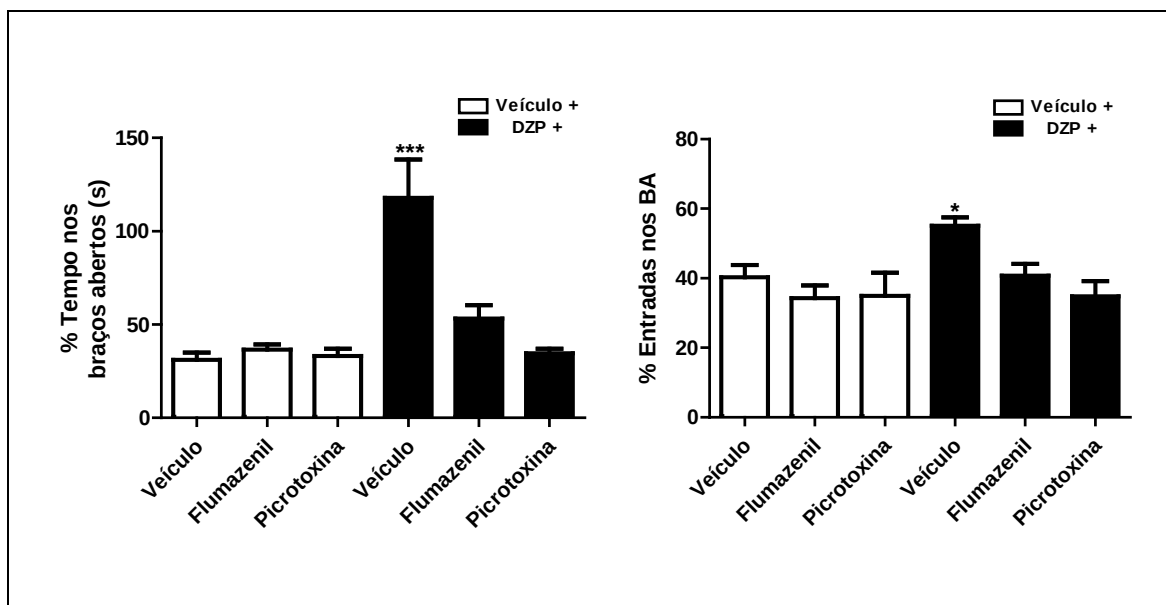


Figura 33 - Efeito da administração aguda de flumazenil (1,0 mg/kg; i.p.), picrotoxina (1,0 mg/kg, i.p.), DZP (0,75 mg/kg, i.p.) ou veículo em camundongos expostos ao teste do LCE: entradas e tempo despendido nos braços abertos, ambos expressos em percentual. N=10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$; * $p < 0,001$ quando comparado com o grupo veículo + veículo.**

A figura 34 mostra os efeitos do EBHA de *A. millefolium* L após o tratamento prévio com flumazenil (1,0 mg/kg, i.p.) e picrotoxina (1,0 mg/kg, i.p.) em camundongos expostos ao LCE. Observaram-se diferenças significativas entre os grupos no % de entradas nos braços abertos ($F_{5,66}=4,68$; $p < 0,01$) e no % de tempo nestes braços ($F_{5,66} = 10,10$; $p < 0,001$). Os grupos tratados com EBHA de *A. millefolium* L apresentaram maior percentual de entradas e tempo despendido nos braços abertos do que os grupos de controle (veículo + veículo, veículo + flumazenil e veículo + picrotoxina, todos com $p < 0,05$), com exceção do percentual de entradas nos braços abertos para os grupos que receberam veículo + flumazenil e *A. millefolium* L + flumazenil ($p > 0,10$). O número total de entradas nos braços abertos e fechados não apresentou diferença significativa entre os grupos ($F_{5,66}=2,14$; $p > 0,05$).

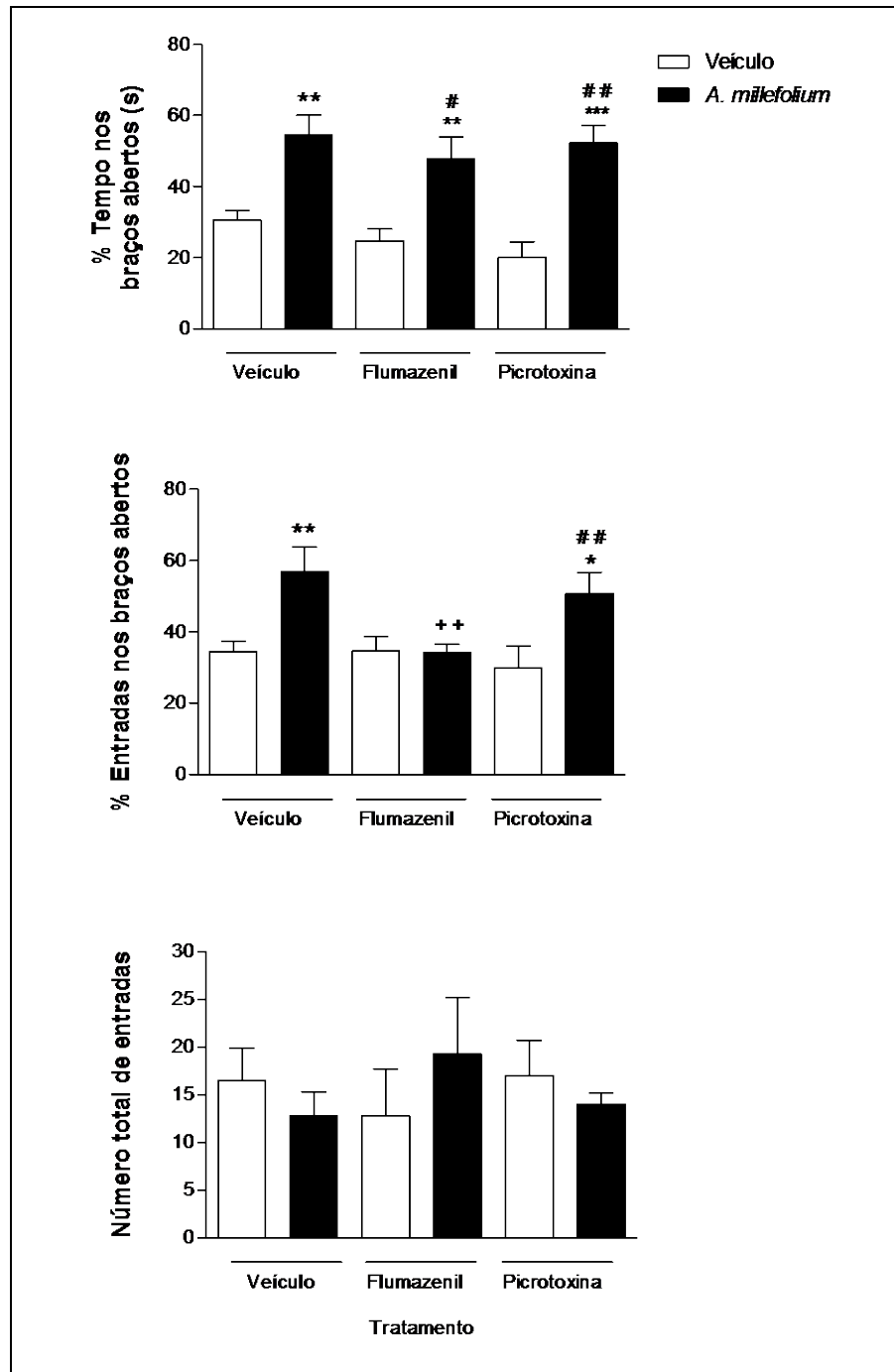


Figura 34 - Efeito da administração oral aguda com EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg) após tratamento prévio de flumazenil (1,0 mg/kg; i.p.), picrotoxina (1,0 mg/kg, i.p.) ou veículo, em camundongos expostos ao teste do LCE: entradas e tempo despendido nos braços abertos, ambos expressos em percentual e total de entradas. N = 12 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. *p<0,05, **p<0,01, *p<0,001 quando comparado com o grupo veículo + veículo; ++p<0,01 quando comparado com o grupo veículo + flumazenil a veículo + picrotoxina; ## p<0,01 quando comparado com o grupo *A. millefolium* L + veículo.**

Os resultados referentes às medidas comportamentais registradas no campo aberto estão representados na Tabela 6. Foram observadas alterações na atividade motora ($F_{5,66} = 3,74$; $p < 0,01$) e no comportamento de levantar ($F_{5,66} = 6,67$; $p < 0,001$). As diferenças na atividade motora foram observadas entre os grupos tratados com *A. millefolium* L + flumazenil e veículo + picrotoxina e entre *A. millefolium* L + flumazenil e *A. millefolium* L + picrotoxina ($p < 0,03$). Enquanto que o comportamento de levantar foi reduzido nos grupos tratados com veículo + picrotoxina, veículo + flumazenil e *A. millefolium* L + picrotoxina (todos $p < 0,05$) em relação ao grupo controle (veículo + veículo). Nenhuma diferença significativa foi observada no comportamento de auto-limpeza ($F_{7,63} = 1,398$; $p > 0,05$) e no número de bolos fecais ($H_{7,63} = 0,68$; $p < 0,05$). Nenhuma alteração foi observada no grupo tratado com veículo + veículo, em relação aos parâmetros avaliados.

Tabela 6 – Efeitos do tratamento prévio, agudo, com flumazenil (1,0 mg/kg) e picrotoxina (1,0 mg/kg) sobre os efeitos do EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg) em camundongos expostos ao teste do campo aberto.

Tratamento	Atividade Locomotora (número de cruzamentos)	Comportamento de levantar (número)	Tempo de Auto-limpeza (s)
Veículo + Veículo	48 ± 7	11 ± 3	9 ± 2
Veículo + <i>A. millefolium</i>	56 ± 4	14 ± 4	9 ± 3
Flumazenil + Veículo	35 ± 5	5 ± 1*	8 ± 1
Flumazenil + <i>A. millefolium</i>	63 ± 8	13 ± 2	12 ± 2
Picrotoxina + Veículo	29 ± 8	2 ± 1*	6 ± 2
Picrotoxina + <i>A. millefolium</i>	26 ± 7	4 ± 2*	4 ± 1

Dados representam a média ± e.p.m.; N = 10 camundongos/grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

5.6 - Efeito da administração aguda via oral, dos flavonóides apigenina, rutina e naringenina na atividade locomotora e ansiolítica em camundongos em diferentes modelos animais.

A Figura 35 mostra os resultados da administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L, apigenina, rutina e naringenina para as medidas comportamentais de entradas e tempo despendido nos braços abertos do LCE, expressos em %.

No experimento com apigenina, a ANOVA de uma via indica uma diferença entre os grupos nos percentuais de entradas ($F_{6,98} = 8,62$; $p < 0,001$) e de tempo despendido ($F_{6,98} = 18,00$; $p < 0,001$) nos braços abertos. Ambos, DZP e EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg) aumentaram o % de entradas nos braços abertos quando comparados com o veiculo (todos $p < 0,05$). A apigenina (3,0 mg/kg) reduziu o % de entradas nos braços abertos quando comparada com os outros grupos. No experimento com a rutina, houve alteração significativa nos percentuais de entradas ($F_{6,63} = 16,42$; $p < 0,0001$) e de tempo despendido ($F_{6,63} = 42,33$; $p < 0,001$) nos braços abertos. A rutina (1,0 mg/kg) e o EBHA de *A. millefolium* L (30 mg/kg) aumentaram o % de entradas nos braços abertos quando comparado ao grupo controle, enquanto que o diazepam e o EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg) aumentaram ambos os parâmetros de exploração dos braços abertos. No experimento com naringenina, observou-se um efeito significativo dos tratamentos nos percentuais de entradas ($F_{6,63} = 3,06$; $p < 0,01$) e de tempo despendido ($F_{6,63} = 42,31$; $p < 0,001$) nos braços abertos. A naringenina não alterou nenhuma das medidas do LCE, nas doses utilizadas, enquanto o EBHA de *A. millefolium* L (30-300 mg/kg) aumentou o % de tempo despendido e de entradas nos braços abertos quando comparado com o controle (todos $p < 0,05$).

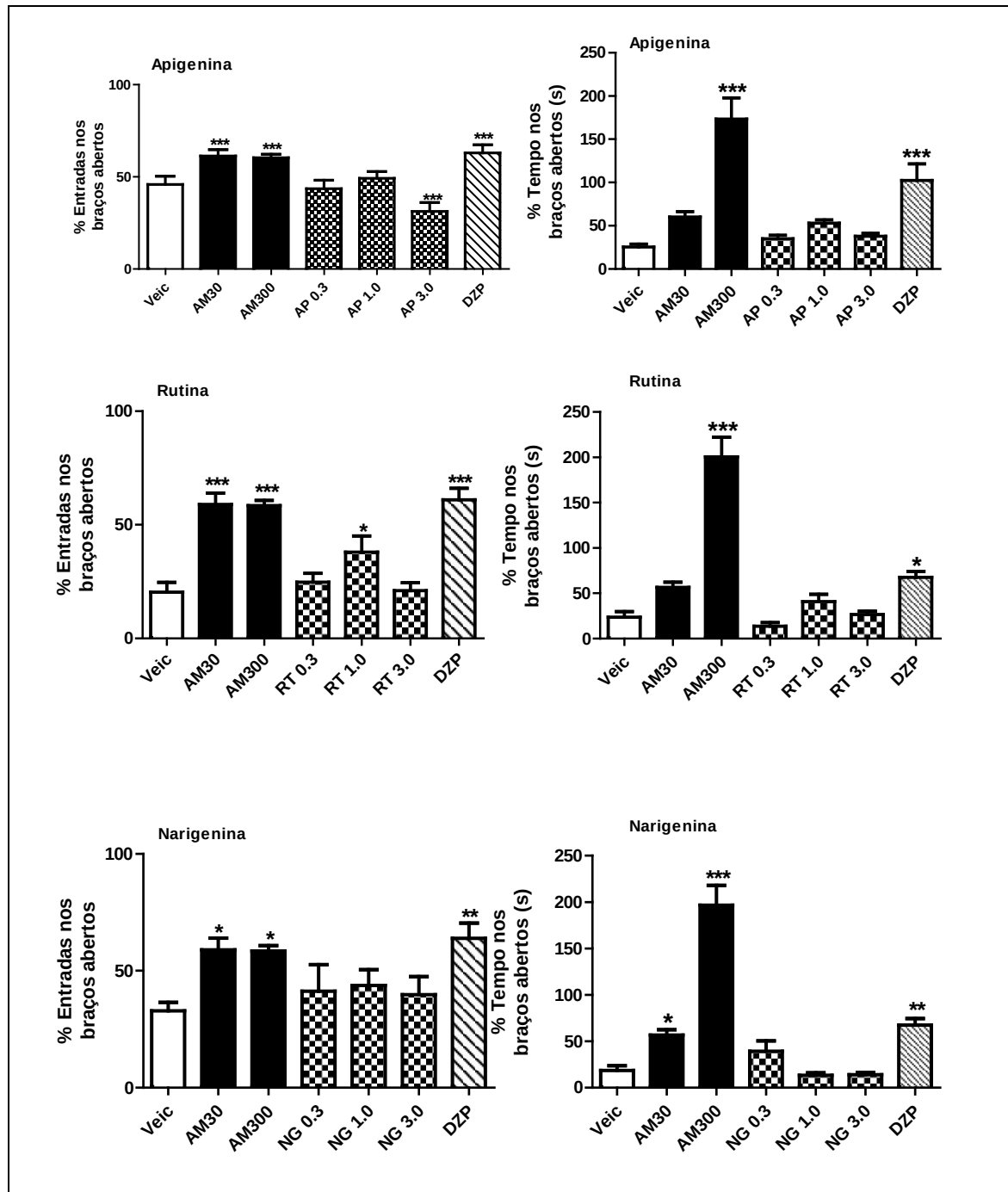


Figura 35 - Efeito da administração aguda com o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg, v.o.), diazepam (0,75 mg/kg, v.o.); apigenina (AP 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p); rutina (RT0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p) e naringenina (NG 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p) em camundongos expostos ao teste do labirinto em cruz elevado: entradas e tempo despendido nos braços abertos, ambos expressos em percentual. N = 15 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. *p<0,05; ** p<0,01 e *p<0,001 quando comparado com o controle.**

A maior dose do EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg) induziu um maior aumento no % de tempo gasto nos braços abertos do que o diazepam ($p < 0,01$). O diazepam aumentou significativamente ambos os parâmetros em comparação com o controle (ambos $p < 0,01$). Nestes experimentos, o DZP aumentou o tempo despendido nos braços abertos quando comparado com o veículo, apigenina, rutina e naringenina.

O número total de entradas nos braços (abertos e fechados; Figura 36) apresentou diferença significativa nos três experimentos (apigenina: $F_{6,98} = 3,33$, $p < 0,01$; rutina: $F_{6,63} = 8,59$, $p < 0,01$; naringenina: $F_{6,63} = 17,55$, $p < 0,01$). No experimento com a apigenina, o EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg) e o diazepam aumentaram o número total de entradas quando comparados com o veículo (todos $p < 0,05$). No experimento com a rutina, observou-se um aumento do número total de entradas no LCE com a rutina (1,0 e 3,0 mg/kg) e com o diazepam (todos $p < 0,05$). No experimento com a naringenina, observou-se um aumento do número total de entradas com o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg) e com o diazepam (todos $p < 0,01$).

Resultados concordantes aos do LCE foram observados no teste de esconder esferas (Figura 37). No experimento com a apigenina ($F_{6,69} = 13,64$; $p < 0,5$), o DZP e o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg) reduziram o número de esferas escondidas quando comparados com outros grupos ($p < 0,05$). Por outro lado, a apigenina (1,0 mg/kg) aumentou o número de esferas escondidas quando comparada com veículo ($p < 0,05$). No experimento com a rutina ($F_{6,84} = 5,51$, $p < 0,5$), o DZP e o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg) reduziram o número de esferas escondidas (todos $p < 0,05$), mas a rutina não apresentou efeito significativo.

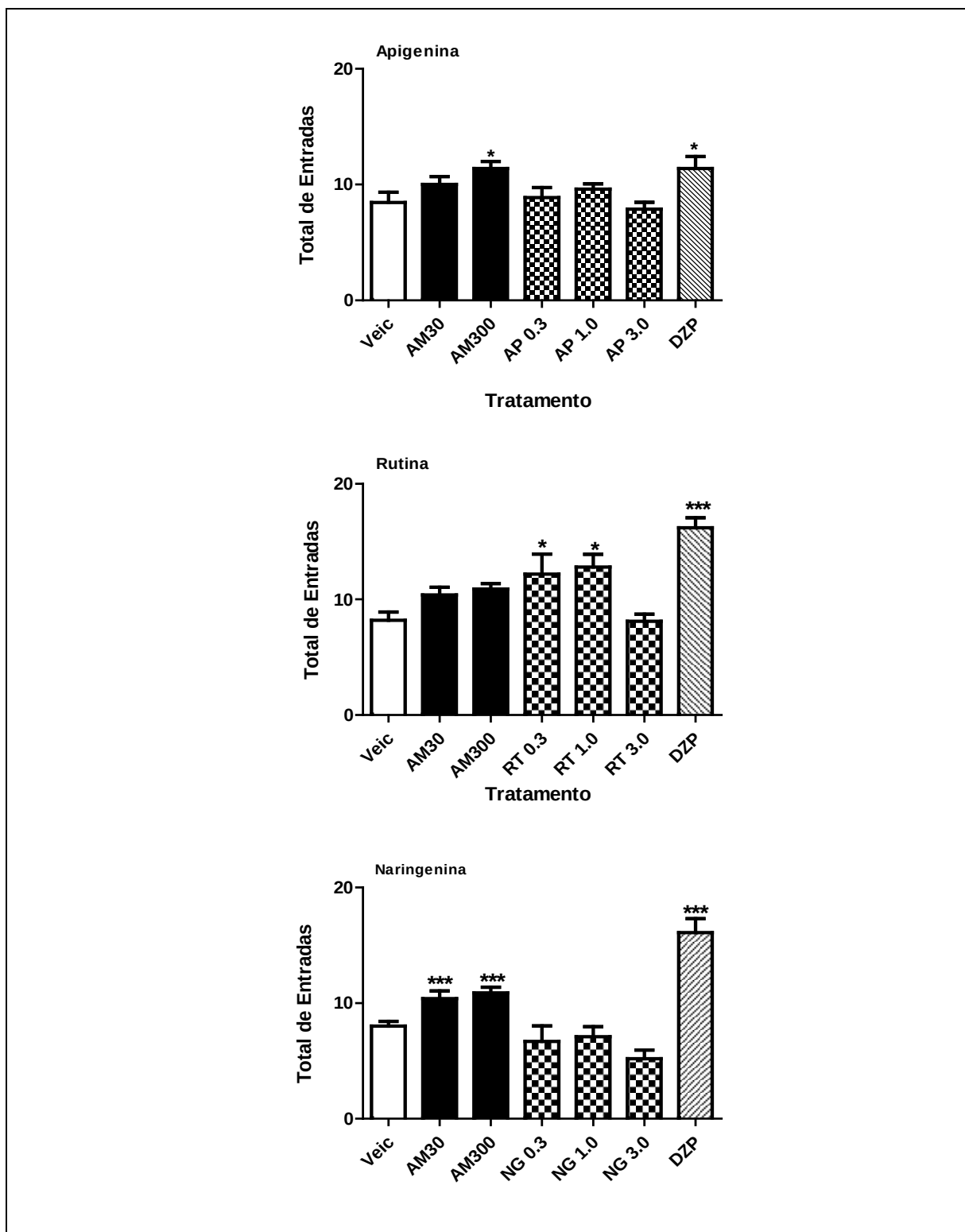


Figura 36 - Efeito da administração aguda com o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg, v.o.), diazepam (0,75 mg/kg, v.o.); apigenina (AP 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p); rutina (RT0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p) e naringenina (NG 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p) em camundongos expostos ao teste do labirinto em cruz elevado: número total de entradas. N = 15 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. *p<0,05; ** p<0,01 e *p<0,001 quando comparado com o controle.**

Já no experimento com a naringenina ($F_{6,84} = 17,39$, $p < 0,05$), novamente o DZP e o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg) reduziram o número de esferas enterradas, enquanto a naringenina (0,3 e 1,0 mg/kg) aumentou o número de esferas escondidas (todos $p < 0,05$).

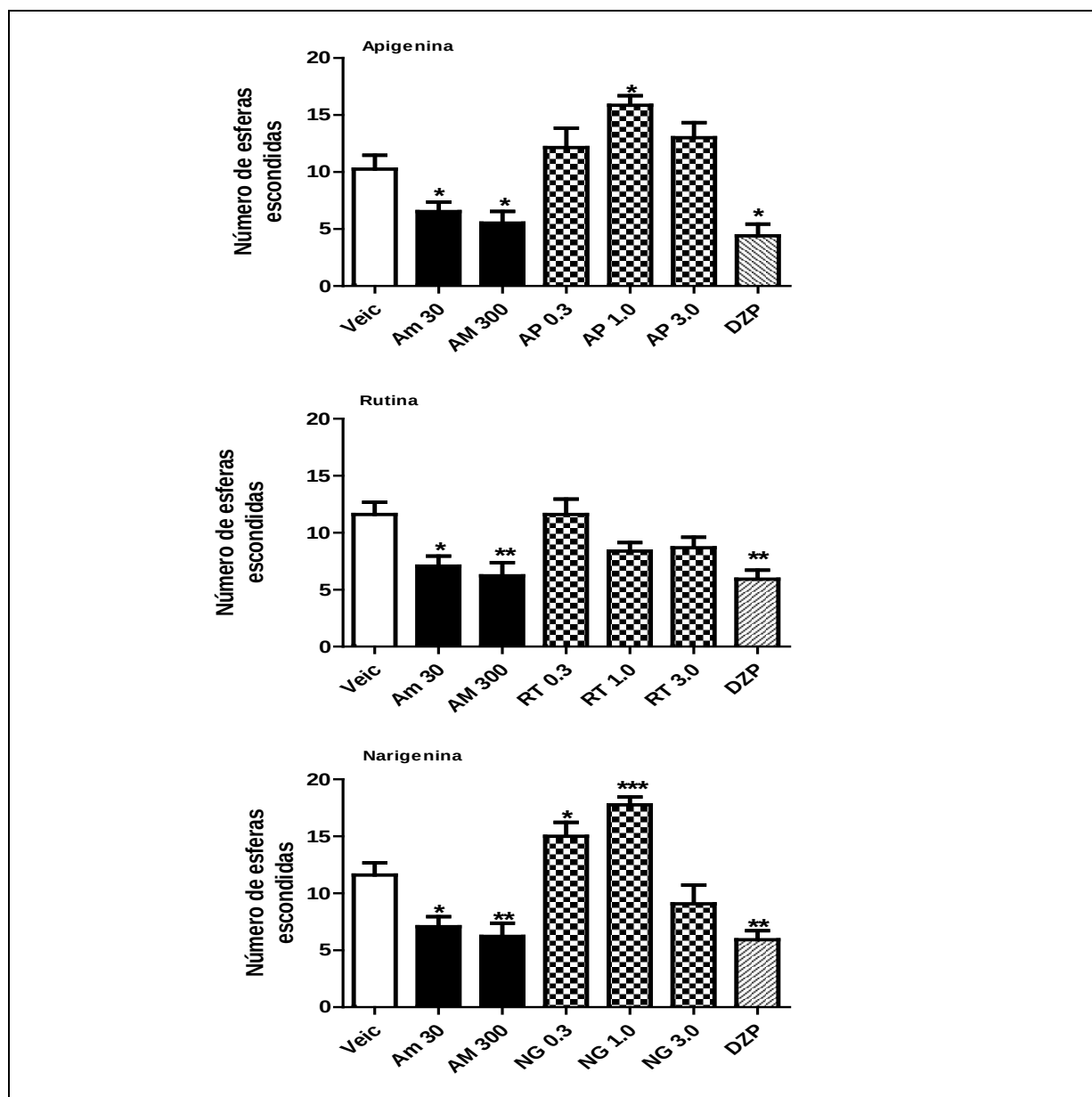


Figura 37 - Efeito da administração aguda com o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg, v.o.), diazepam (0,75 mg/kg, v.o); apigenina (AP 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p); rutina (RT 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p) e naringenina (NG 0,3; 1,0 e 3,0 mg/kg, i.p) em camundongos expostos ao teste de esconder esferas. N = 15 animais/grupo. Os dados estão representados como a média ± e.p.m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ quando comparado com o controle.**

5.7 - Ensaio de Binding [^3H]-flunitrazepam

A incubação aguda *in vitro* com EBHA de *A. millefolium* L (1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$) não alterou o *binding* específico de [^3H]-flunitrazepam em membranas cerebrais de ratos (Figura 38). O diazepam (1 mM) foi utilizado como controle positivo e reduziu significativamente o *binding* específico [^3H]-flunitrazepam em $86 \pm 1\%$.

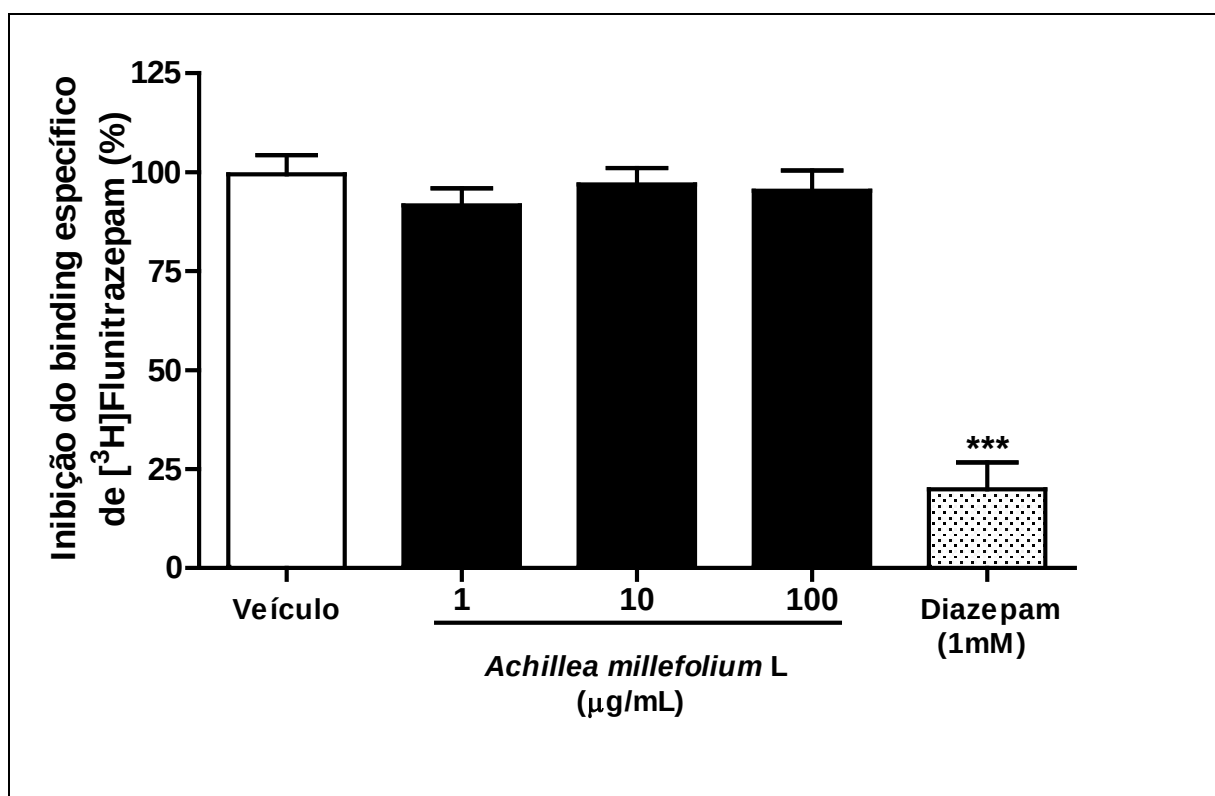


Figura 38. Efeitos do EBHA de *A. millefolium* L (1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$) e diazepam (1 mM) no *binding* específico de [^3H]-flunitrazepam em membranas cerebrais de ratos. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. (n=4/triplicata) ***p<0,001 quando comparado com o controle.

5.8 - Efeito da administração aguda e repetida (25 dias), via oral, com EBHA de *A. millefolium* L na atividade antidepressiva em camundongos em diferentes modelos animais.

Como apresentado na Figura 39 a administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L nas doses de 30 e 300 mg/kg e de imipramina (10 mg/kg) reduziu o tempo de imobilidade (Figura 39A - lado esquerdo) em comparação ao grupo tratado com veículo. A ANOVA de uma via revelou redução significativa no tempo de imobilidade ($F_{4,45} = 13,63$; $p < 0,001$) para os grupos tratados com o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg) e imipramina (10 mg/kg) quando comparados com os demais grupos (todos $p < 0,05$). Por outro lado, o diazepam (0,75 mg/kg) aumentou o tempo de imobilidade em relação a todos os grupos ($p < 0,01$).

Na administração repetida (Figura 39) a ANOVA de uma via revelou um efeito significativo no tempo de imobilidade ($F_{4,45} = 6,00$; $p < 0,001$) e indicou que o EBHA de *A. millefolium* L na dose de 30 mg/kg e a imipramina na dose de 10 mg/kg reduziram significativamente o tempos de imobilidade dos camundongos no teste de natação forçada quando comparados com o veículo (todos $p < 0,05$). A dose de 300 mg/kg do EBHA de *A. millefolium* L e o diazepam (0,75 mg/kg) não apresentaram efeito sobre o tempo de imobilidade (Figura 39A - lado direito).

A latência para a imobilidade, no teste de natação forçada, após a administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L nas doses de 30 e 300 mg/kg e de imipramina (10 mg/kg) foi aumentada significativamente ($F_{4,45} = 21,28$; $p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado com veículo ((Figura 39B - lado esquerdo). Após a administração repetida (25 dias) ocorreu aumento significativo ($F_{4,45} = 9,59$; $p < 0,0001$) da latência para a imobilidade apenas nos grupos tratados com imipramina e EBHA de *A. millefolium* L na dose de 30 mg/kg (Figura 39B - lado direito).

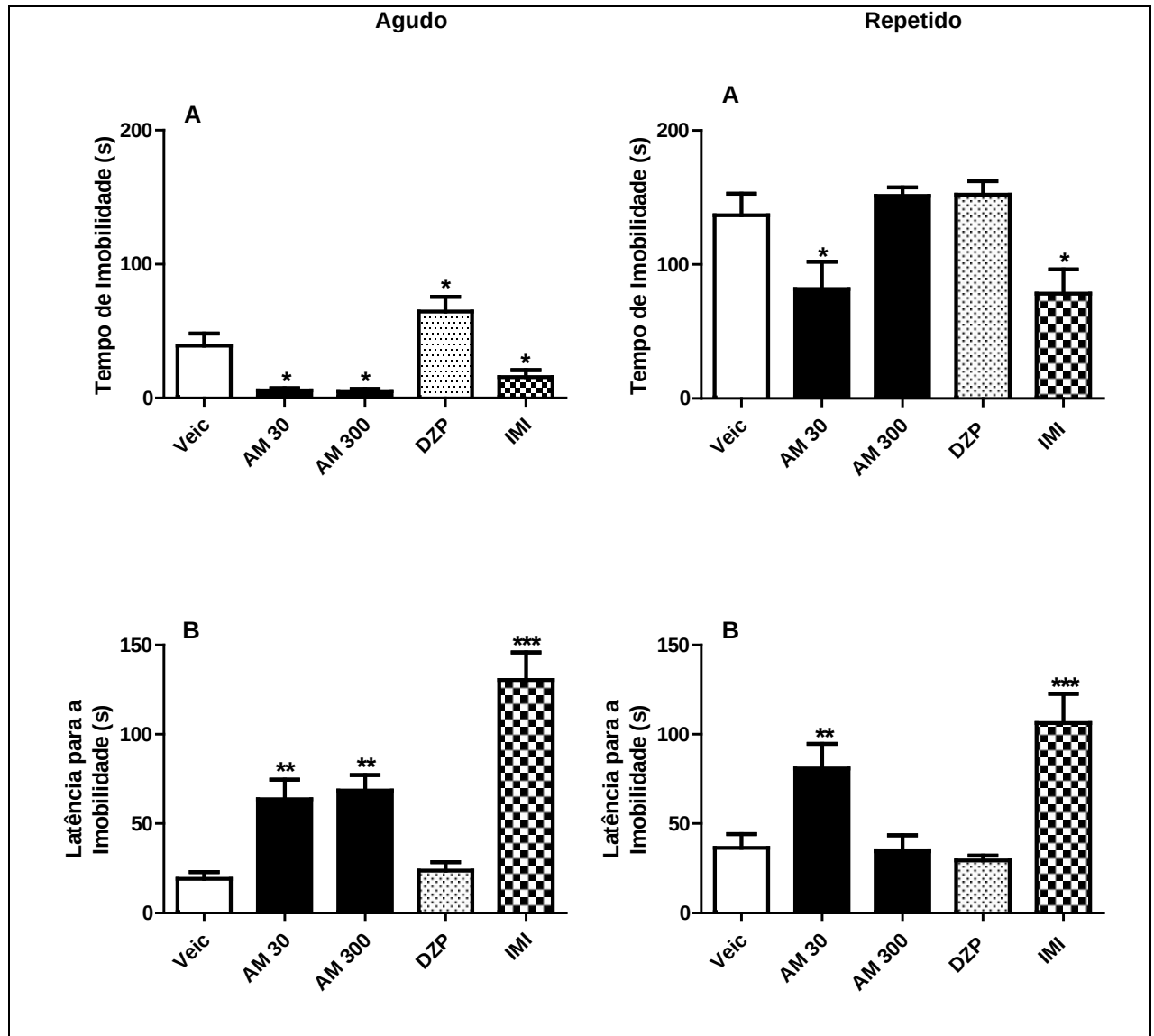


Figure 39 – Efeito da administração aguda e repetida (25 dias) com o EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg, v.o.), imipramina (IMI 10 mg/kg, v.o.) e diazepam (DZP 0,75 mg/kg, v.o.) em camundongos expostos ao teste de natação forçada: tempo de imobilidade (A) e latência para a imobilidade (B). N=10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ quando comparado com o controle.**

No teste de suspensão pela cauda o tempo de imobilidade foi reduzido significativamente ($F_{4, 45} = 3,82$; $p < 0,01$) para o grupo tratado agudamente com imipramina (10 mg/kg) quando comparado com todos os outros grupos (todos $p < 0,05$; Figura 40A - lado esquerdo). Por outro lado, tanto os camundongos tratados repetidamente (25 dias; Figura 40A – lado direito) com EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg) quanto com imipramina (10 mg/kg) apresentaram uma

redução significativa no tempo de imobilidade ($F_{4,45} = 16,14$; $p < 0,001$) quando comparados com os grupos tratados com veículo e com DZP (0,75 mg/kg; todas as comparações com $p < 0,01$).

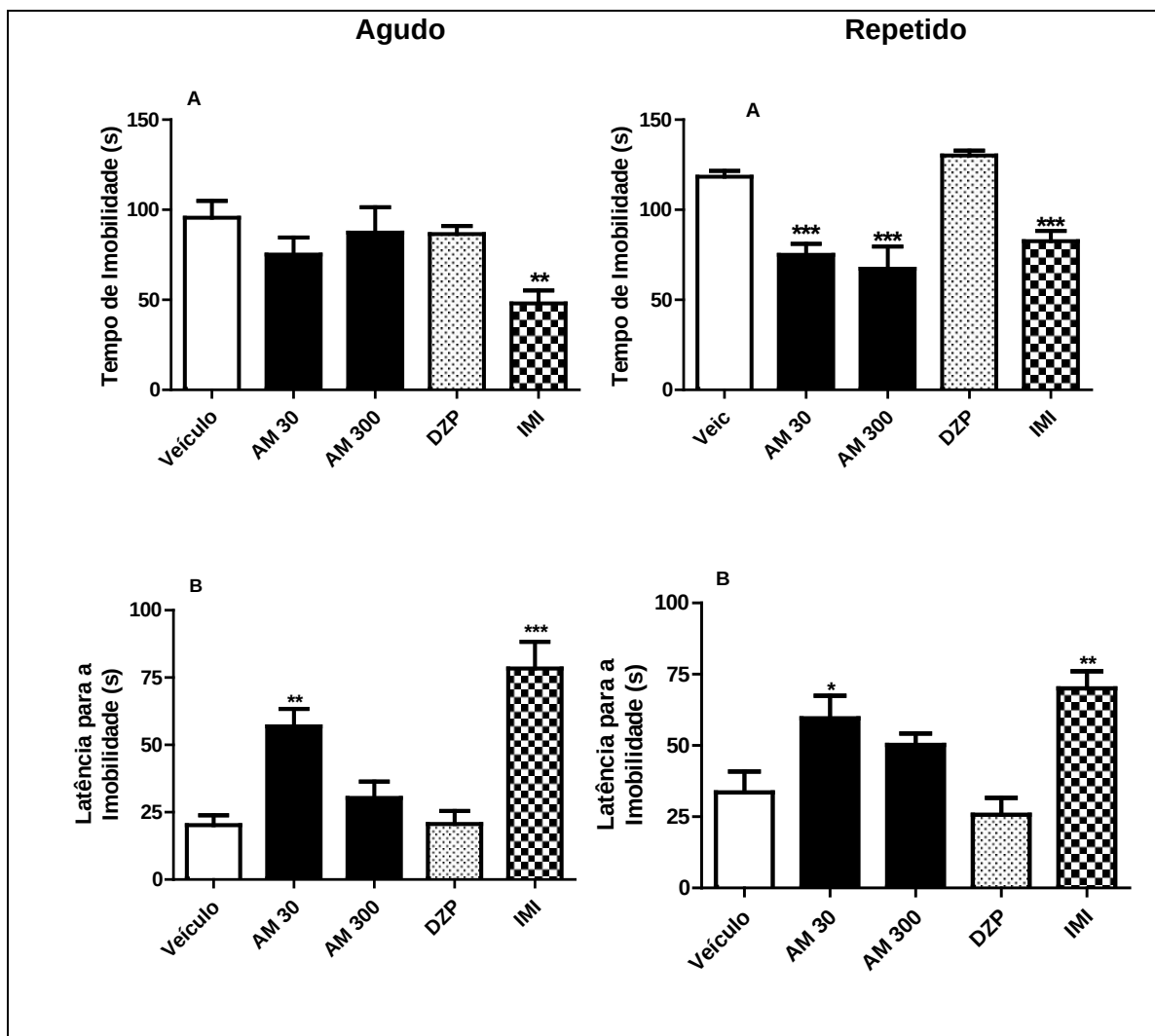


Figure 40 - Efeito da administração aguda e repetida (25 dias) com EBHA de *A. millefolium* L (30 e 300 mg/kg, v.o.), imipramina (IMI 10 mg/kg, v.o.) e diazepam (DZP 0,75 mg/kg, v.o.) em camundongos expostos ao teste de suspensão pela cauda: tempo de imobilidade (A) e latência para a imobilidade (B). N = 10 animais/grupo. Os dados estão representados como a média $\pm$ e.p.m. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ quando comparado com o controle.**

A latência para a imobilidade, no teste de suspensão pela cauda, após a administração aguda do EBHA de *A. millefolium* L nas doses de 30 mg/kg e de imipramina (10 mg/kg) foi aumentada significativamente ($F_{4,45} = 15,30$; $p < 0,0001$)

em comparação ao grupo tratado com veículo (Figura 40B – lado esquerdo). O mesmo ocorreu após a administração repetida (25 dias; Figura 40B – lado direito) do EBHA de *A. millefolium* L na dose de 30 mg/kg e de imipramina (10 mg/kg) que promoveu aumento significativo ($F_{4,45} = 8,06$; $p < 0,05$) da latência para a imobilidade. Os grupos tratados com diazepam ou EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg) não alteraram a latência para a imobilidade no teste de suspensão pela cauda.

5.9 - Dosagens de Monoaminas e Metabólitos no encéfalo de camundongos por HPLC-DE

A Tabela 7 demonstra os resultados dos níveis de monoaminas e seus metabólitos em diferentes áreas cerebrais relacionadas ao comportamento. Diferenças significativas foram observadas em relação aos níveis de DA no córtex frontal [$U = 4,00$; $p < 0,01$] e hipocampo [$U = 4,00$; $p < 0,01$] e nos níveis de serotonina no estriado [$U = 4,00$; $p < 0,01$]. Os níveis de DA no estriado não diferiram ($p = 0,07$). A *A. millefolium* L (300 mg/kg) diminuiu significativamente os níveis de DOPAC no hipocampo ($U = 10,0$ $p < 0,05$).

Tabela 7 - Efeito do EBHA de *A. millefolium* L (300 mg/kg, v.o.) administrado repetidamente (25 dias) nos níveis de serotonina (5-HT), noradrenallina (NA) e dopamina (DA) presentes no córtex frontal, hipocampo, amígdala e estriado de ratos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Monoaminas e seus metabólitos (ng/g)					
		5-HT	5-HIAA	NA	DHPG	DA	DOPAC
Córtex Frontal							
Veículo	0	328 ± 49	270 ± 42	155 ± 34	254 ± 74	9 ± 2	47 ± 12
A millefolium	300	387 ± 41	294 ± 45	223 ± 51	296 ± 37	19 ± 3*	31 ± 6
Hipocampo							
Veículo	0	303 ± 71	380 ± 87	221 ± 28	143 ± 28	6 ± 1	32 ± 3
A millefolium	300	300 ± 37	457 ± 85	291 ± 35	260 ± 136	22 ± 9*	24 ± 9*
Amígdala							
Veículo	0	543 ± 57	396 ± 32	180 ± 35	233 ± 44	44 ± 8	74 ± 3
A millefolium	300	554 ± 30	429 ± 59	252 ± 43	225 ± 32	130 ± 74	129 ± 34
Estriado							
Veículo	0	332 ± 31	337 ± 20	156 ± 76	249 ± 52	2829 ± 402	3869 ± 544
A millefolium	300	553 ± 89*	523 ± 96	253 ± 110	231 ± 77	5113 ± 974 ^(*)	3144 ± 110

Valores representados como a média ± e.p.m. ^(*) 0,10 > p > 0,05 comparados ao veículo; * p < 0,05 comparado ao veículo e [#] p < 0,05 comparado ao EBHA de *A. millefolium* L 300mg/kg.

O interesse na natureza como fonte potencial de agentes terapêuticos vem desde a antiguidade. Os produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todos os fármacos utilizados na clínica (SOUZA, 2004; GURIB-FAKIM, 2006). Portanto a contribuição dos produtos naturais no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos é inquestionável, sem contar na busca de novos agentes originados de plantas medicinais para doenças psiquiátricas (ZHANG, 2004).

Mesmo com o uso tradicional e o elevado consumo, não há estudos científicos que comprovem a efetividade ou mesmo a toxicidade de muitas espécies utilizadas popularmente (ROCHA *et al.*, 2005; ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006). Várias plantas que estão sendo estudadas são capazes de atuar no comportamento, como o humor, o pensamento e as sensações, onde o grande desafio é o entendimento dos mecanismos de ação, segurança e eficácia (CARLINI, 2003; CARLINI *et al.*, 2006). Com o avanço nas pesquisas, a constituição química das plantas que apresentam atividade ansiolítica e antidepressiva estão sendo investigadas, possibilitando o surgimento de novos produtos para a prática clínica.

Apesar desses avanços ainda encontramos dificuldades na validação de plantas, principalmente devido à variação na constituição e a concentração de princípios ativos. Os principais fatores que interferem na produção dos princípios ativos e metabólitos secundários são: sazonalidade, ritmo circadiano, desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude e indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (GOOBO-NETO e LOPES, 2007; SIMÕES *et al.*, 2007).

Uma grande vantagem em fazer uso de espécies vegetais como ponto de partida para novos fármacos, é que a identificação de plantas promissoras não se

baseia no mecanismo de ação, aumentando a chance de descobrir novos mecanismos de ação, colaborando para a redução da ocorrência de fármacos “*me too*”, que são supostas novidades farmacológicas, mas que, na realidade, são modificações em estruturas já conhecidas e que atuam pelas mesmas vias (ELISABETSKY, 2002; FAUSTINO *et al.*, 2010).

A maioria dos medicamentos fitoterápicos indicados para o tratamento de distúrbios psiquiátricos são extratos brutos ou semi-purificados, como os de *Hypericum perforatum* (erva-de-São-João), *Gingko biloba* (gingko), *Panax ginseng* (ginseng), *Melissa officinalis* (melissa), *Valeriana officinalis* (valeriana), *Crataegus oxyacantha* (pilriteiro ou cratego), *Piper methysticum* (kava-kava) e diferentes espécies de *Passiflora* (maracujá), os quais reacenderam o interesse da indústria farmacêutica por produtos de origem vegetal (MONTANARI e BOLZANI, 2001).

Alguns compostos isolados foram identificados como agentes ansiolíticos (flavonóides, kavalactonas, magnolol, entre outros) e como antidepressivos (ácido rosmarínico, ácido cafeico, apigenina e outros) (ZHANG, 2004). Paladini *et al.* (1999) demonstraram que alguns flavonóides isolados atuam como depressores do SNC através da ativação de receptores benzodiazepínicos. Por outro lado, as procianidinas presentes em muitas plantas medicinais, como *Hypericum perforatum* e *Theobroma cacao* (REIN *et al.*, 2000; PLOSS *et al.*, 2001) bloqueiam, *in vitro*, a captação de monoaminas no SNC (JENSEN *et al.*, 2001; WONNEMANN *et al.*, 2001) e também apresentam efeito do tipo antidepressivo nos modelos animais da natação forçada (BUTTERWECK *et al.*, 1998; BUTTERWECK *et al.*, 2000) e de suspensão pela cauda (SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2007).

Como já descrito na introdução desta tese, as plantas do gênero *Achillea* (Asteraceae) têm sido usadas na medicina popular devido às suas numerosas propriedades medicinais (SI *et al.*, 2006), como por exemplo, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, propriedades analgésicas e antipiréticas, e nos quadros vasculares, de afecções da pele, de hipertensão arterial, de asma, de gastrite, de úlcera e ações depressora do SNC e anti-conflito, entre outras (FONT QUER, 1985; REYES e SARAIVA, 1995; ALONSO, 1998; ALJANCIC *et al.*, 1999; CÁCERES, 1999; BLUMENTHAU *et al.*, 2000; MORS *et al.*, 2000; MOLINA-HERNANDEZ *et al.*, 2004; OTUKI *et al.*, 2005; BENEDEK *et al.*, 2007). Diversas destas indicações populares já foram comprovadas cientificamente (por exemplo para o tratamento de úlcera gástrica (CAVALCANTI *et al.*, 2006).

A *A. millefolium* L é considerada uma planta de baixa toxicidade. Esse fator facilita a sua utilização pela população, sendo classificada como de uso seguro (DUKE, 1987), além de já ter sido aprovada pela *Food and Drug Association* (FDA) em bebidas alcoólicas (BLUMENTHAL *et al.*, 2000). Cavalcanti *et al.* (2006) demonstraram que o extrato aquoso bruto das partes aéreas isentas de inflorescência de *A. millefolium* L administrado agudamente ou o tratamento diário com uma dose (0,3; 0,6 ou 1,2 g/kg) não promove alteração das funções hepáticas, renal, pancreática e hematológica de ratos machos e fêmeas. Ainda, que a administração do extrato de *A. millefolium* L, via oral ou intraperitoneal, nas doses de 10 g/kg e 3 g/kg, respectivamente, produziram mortalidade abaixo de 50% nos animais tratados (CAVALCANTI, 2002). Estudos pré-clínicos não indicam toxicidade reprodutiva da *A. millefolium* L (BOSWELL-RUYS, *et al.*, 2003; DALSENTER, *et al.*, 2004).

A espécie *millefolium* é uma das mais conhecidas do gênero *Achillea*, sendo seu uso medicinal relatado desde os primórdios da medicina (2200 a.C.). Estudos fitoquímicos mostraram a presença de óleo essencial (camazuleno, cânfora, mentol, eugenol, azuleno, linalol e 1,8-cineol) (CHANDLER, 1989; HOFMANN *et al.*, 1992; PANIZZA, 1997; BLUMENTHAL *et al.*, 2000; GUARRERA *et al.*, 2001; LORENZI e MATOS, 2002; PEANA *et al.*, 2003; ORAV, *et al.*, 2006); de flavonóides como a apigenina; rutina; luteolina, artemetina e quercetina (GUEDON *et al.*, 1993; WAGNER, 1996; TESKE E TRENTIN, 1997; LEE *et al.*, 1998; SI *et al.*, 2006; INNOCENTI *et al.*, 2007; BENEDEK *et al.*, 2007b; BENETIS *et al.*, 2008; KOCEVAR *et al.*, 2008; CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2009); de sesquiterpenes (paulitina, isopaulitina, sistenina, entre outros) (GLASL *et al.*, 2002; CSUPOR-LOFFLER *et al.*, 2009); de alcalóides (achileina) (MILLER e CHOW, 1954), esteróides (estigmasterol, colesterol, entre outros) e de triterpenos (α e β -amirina, taraxasterol, entre outros) (CHANDLER *et al.*, 1982; HEINRICH *et al.*, 1998; LORENZI e MATOS, 2002). Taninos, mucilagens, cumarinas, resinas, saponinas, ácidos graxos e princípio amargo (PANIZZA, 1997; HEINRICH *et al.*, 1998; MARTINS *et al.*, 2000; LORENZI e MATOS, 2002; PIRES *et al.*, 2009); ácido cafeico e derivados (INNOCENTI *et al.*, 2007; BENEDEK *et al.*, 2007), também foram identificados na planta. Dentre as classes de polifenóis, os flavonóides são os compostos mais estudados. Os flavonóides possuem um esqueleto difenilpropano e são divididos em seis subclasses: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (catequinas e proantocianidinas).

A análise fitoquímica, qualitativa, realizada em nosso trabalho confirmou a presença de flavonóides, flavononas, flavononóis, xantonas, taninos, catequinas, saponinas e ácidos fixos fortes no extrato bruto hidroalcólico das partes aéreas da

planta *A. millefolium* L. A presença destes grupos de metabólitos secundários foi confirmada, qualitativamente, pela literatura como compostos presentes em diversas espécies deste gênero (SOUZA *et al.*, 2005; ORAV *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2006; KOCEVAR *et al.*, 2008; BENETIS *et al.*, 2008; PIRES *et al.*, 2009).

Divergência, entre ações das plantas, foram observadas na literatura estudada devido algumas variáveis, citadas anteriormente, além da forma de preparo (decocção, infusão, maceração) e o tipo de tratamento (via de administração, posologia, concentração) a ser realizado com a planta estudada, o que dificulta muitas vezes a validação daquela espécie utilizada pela população.

Extratos vegetais, chás e alimentos fornecem uma quantidade grande de constituintes, que parecem agir inter funcionalmente com diferentes sistemas de órgãos do corpo, incluindo o cérebro (CARLINI, 2003; BASTIANETTO *et al.*, 2007). Entre esses constituintes os polifenóis e flavonóides, especialmente têm sido estudados, pois atravessam facilmente a barreira hematoencefálica e alteram funções cerebrais (MANDEL *et al.*, 2008). Na avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais com atividades relacionadas ao SNC, são utilizados diversos modelos experimentais animais. Os modelos animais apresentam inúmeras vantagens, entre elas: o controle das condições ambientais, o estado de saúde e o bem estar dos animais (VAN DER STAAY, 2004).

Caso o composto da planta em estudo reproduza alguns parâmetros semelhantes, quando comparados com medicamentos de referência, com eficácia clínica conhecida, pode ser considerado útil para a doença de que o modelo foi usado (CARLINI, 2003). Na avaliação de uma planta com atividade promissora, por exemplo ansiolítica ou antidepressiva, são utilizados diferentes testes animais para

cada atividade. Porém alguns fatores limitam as pesquisas da depressão e ansiedade, uma vez que a depressão se trata de uma emoção em resposta a uma situação desfavorável (depressão reativa) ou pode constituir-se num transtorno psiquiátrico (depressão endógena; TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2006) e a ansiedade é um conceito que descreve um estado subjetivo, considerada uma característica humana. Por isso, na melhor das hipóteses, a ansiedade pode ser apenas modelada e não reproduzida em animais (MARTIN, 1998; ANDREATINI *et al.*, 2001; LEITE e SIQUEIRA, 2006).

Um modelo animal de ansiedade deve ter validade preditiva, mas também validade de face e validade de construto. Validade preditiva se refere à sensibilidade do modelo em reconhecer ansiolíticos, mas não outros tipos de agentes. Validade de face implica que o modelo produz reações como o medo em animais e que são análogas ao comportamento de ansiedade observada em humanos. Validade de construto é mais difícil, pois implica homologia, ou correspondência direta, entre o modelo animal e a condição sendo modelada (RODGERS e COLE, 1994; ANDREATINI *et al.*, 2006).

Assim os modelos animais úteis para avaliar drogas ansiolíticas devem: (1) reproduzir características comportamentais e patológicas da síndrome de ansiedade; (2) permitir investigação de mecanismos neurobiológicos que não são facilmente estudados no homem; e (3) permitir a avaliação confiável de agentes ansiolíticos, assim como identificar efeitos ansiogênicos de drogas e toxinas (ANDREATINI *et al.*, 2001). Entre os modelos animais mais utilizados para avaliar a atividade ansiolítica de compostos está o LCE. Utiliza-se também o campo aberto, placa perfurada, neofobia ou hipofagia emocional, teste de exploração na caixa claro-escuro (não

condicionados, baseados no comportamento natural dos animais, que tendem a explorar ambientes novos), teste de conflito de Vogel, teste de esconder esferas, teste de quatro placas e o sobressalto potencializado pelo medo (condicionado, no qual estímulos aversivos são associados ao ambiente novo), entre outros.

Segundo Bourin *et al.* (2007), muitos modelos animais de ansiedade são validados baseando-se na farmacologia dos BZD, ansiolíticos clássicos, que apresentam início de efeito rápido. Clinicamente, os BZD apresentam benefícios bem descritos e caracterizados, porém seus efeitos colaterais predominantes incluem relaxamento muscular, sedação, amnésia anterógrada e dependência física o que leva os pacientes a buscarem por novas drogas e/ou terapias complementares e entre elas o tratamento com plantas medicinais (ERNEST, 2006; RAUPP, *et al.*, 2008).

De acordo com estudos em modelos animais (IMAMURA e PRASAD, 1998) os efeitos ansiolíticos dos BZD são amplamente reprodutíveis (PELLOW *et al.*, 1985), assim pode-se supor que as substâncias capazes de reduzir a ansiedade dos animais expostos a esses paradigmas poderia exercer seu efeito através de um mecanismo de ação semelhante ao dos BZD (TREIT, 1985). Como controle positivo utilizam-se benzodiazepínicos típicos, como o diazepam e o lorazepam (BOURIN *et al.*, 2007; ZHANG, 2004). No LCE o diazepam (DZP) acarreta um aumento da % de tempo e/ou de entradas nos braços abertos, sem alterar a atividade locomotora (DALVI e RODGERS, 1996; TREIT, MENARD e ROYAN, 1993; PELLOW *et al.*, 1985; HANDLEY e MITHANI, 1984).

Entretanto, vários transtornos de ansiedade são resistentes ao tratamento com BZD e a maioria dos modelos animais avalia fenômenos que são modificados

pelos BZD, e não a “ansiedade” propriamente dita (ANDREATINI *et al.*, 2001), embora existam várias substâncias ansiolíticas com ação sobre os sistemas noradrenérgico, serotoninérgico e glutamatérgico (DAWSON e TRICKLEBANK, 1995). Sugere-se também a realização de testes complementares para avaliação da atividade locomotora, exploratória, hipnosedativa, a fim de se evitar resultados falso-positivos (RODGERS *et al.*, 1997).

A atividade comportamental dos animais, especialmente roedores, pode ser resultado de diferentes tendências ou “impulsos”, pode ser uma atividade específica relacionada à exploração do ambiente ou à esquia de aspectos particulares do ambiente ou simplesmente uma atividade geral inespecífica. Nos testes laboratoriais usando a ambulação como única medida de comportamento espontâneo, como no campo aberto, sua ocorrência pode ser resultado de impulsos opostos, exploratório e emocional, havendo um conflito entre explorar o novo ambiente, que é a tendência natural dos animais, e o medo gerado pela novidade. A esse respeito tem sido demonstrado que as atividades exploratória e motora variam independentemente e podem ser dissociadas sob influências ambientais e farmacológicas (STEENBERGEN *et al.*, 1991). Outras ações mais inespecíficas de extratos de plantas ou drogas no SNC como hipotermia, sedação, relaxamento muscular e incoordenação motora, podem mascarar efeitos centrais específicos dos compostos, razão pelas quais alguns testes são utilizados como complementação à avaliação de efeitos específicos no SNC.

Na triagem farmacológica comportamental realizada em nosso estudo, os resultados obtidos com o EBHA mostraram que a dose de 300 mg/kg promoveu um aumento da atividade motora e a dose de 600 mg/kg levou a sedação, 30 min após

a administração. Para as doses de 30 e 100 mg/kg, após uma hora da administração, nenhuma alteração foi observada. Entretanto nos modelos comportamentais utilizados, em que as avaliações são sistematizadas e existe um maior controle de variáveis, os parâmetros de atividade motora (p.ex. número de cruzamentos no campo aberto e total de entradas no LCE) não foram alterados pelo extrato. Portanto concluímos que o EBHA nas doses utilizadas não altera a atividade motora.

Nosso estudo mostrou que o EBHA de *A. millefolium* L, administrado aguda e repetidamente (25 dias) em camundongos, promoveu efeito do tipo ansiolítico no LCE e no teste de esconder esferas (aumento da exploração dos braços abertos e diminuição do número de esferas escondidas, respectivamente), nos modelos para triagem de drogas ansiolíticas. O LCE é um modelo baseado na aversão natural de roedores para espaços abertos e usa o conflito entre a exploração e aversão a este tipo de lugar, sendo muitas vezes referido como modelo de conflito comportamental não-condicionado (BOURIN *et al.*, 2007). É uma ferramenta importante na busca de novas moléculas e/ou substâncias com atividade ansiolítica (CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005). Os parâmetros comportamentais do LCE estão relacionados a ansiedade e atividade motora, dois fatores independentes, onde os parâmetros relacionados ao braços abertos (porcentagem de entradas e tempo de permanência) são medidas para avaliação da ansiedade. Bourin *et al.* (2007) relatam ainda que o LCE oferece algumas vantagens, como a não privação de alimento, de água e a não administração de choque, quando comparado com outros modelos.

Nossos resultados mostraram que os tratamentos, agudo (30, 100, 300 e 600 mg/kg) e repetido (30 e 300 mg/kg) com o EBHA de *A. millefolium* L e com o

DZP aumentaram significativamente a frequência de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos quando comparados ao grupo que recebeu veículo. Tanto o DZP, droga controle positivo, quanto o EBHA de *A. millefolium* L, nas doses utilizadas, apresentaram o mesmo perfil de resposta, demonstrando um efeito do tipo ansiolítico para esta planta quando avaliada neste modelo. Em relação ao número total de entradas (braços abertos + fechados) o EBHA de *A. millefolium* L, nas doses utilizadas não promoveu qualquer alteração.

Portanto, estes resultados corroboram e ampliam os dados da literatura que mostram respostas semelhantes no teste de conflito operante, modelo que envolve privação de alimento e administração de água ou choque nas patas. Molina-Hernandez *et al.* (2004) observaram um efeito anti-conflito com a administração de *A. millefolium* L na fase de pró-estro e, em doses maiores, de diestro. Estes resultados sugerem uma possível interação entre a *A. millefolium* L e hormônios esteroidais. Nossos resultados indicam que a *A. millefolium* L, também induz efeito tipo ansiolítico em animais machos. Além disso, considerando que o modelo de conflito emprega administração de choque e privação de alimento, e que a *A. millefolium* L parece exercer efeitos analgésicos (redução nas contorções abdominais induzidas por ácido acético; PIRES *et al.*, 2009), nossos dados indicam que o efeito ansiolítico induzido pela *A. millefolium* L não foi devido alteração de sensibilidade à dor ou do apetite (RODGERS *et al.*, 1997; CAROBREZ e BERTOGLIO, 2005).

Em se tratando de avaliação de comportamentos ansiosos, em condições naturais ou em laboratórios, os ratos e camundongos apresentam o instinto de enterrar objetos potencialmente desagradáveis ou ameaçadores presentes em seu

ambiente. Este comportamento que consiste em escavar a serragem por cima da fonte aversiva usando o focinho e as patas dianteiras a fim de evitar e se proteger da ameaça, é descrito como um comportamento defensivo refletindo o estado de ansiedade dos animais (REICHERT, 2011).

O teste de esconder esferas é um modelo experimental baseado neste comportamento defensivo dos roedores frente a estímulos aversivos, que é o comportamento de enterrar ou esconder as bolas de vidro. Ansiolíticos clássicos suprimem este comportamento, apesar de outras classes de drogas, como os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), também reduzirem ou abolirem esta resposta, indicando ausência de especificidade farmacológica do teste de esconder esferas. Tem sido proposto que este modelo estaria muito mais relacionado com o transtorno obsessivo-compulsivo (TOC), que é caracterizado pelas obsessões (pensamentos recorrentes que levam a ansiedade acentuada e desconforto) e/ou compulsões (comportamentos estereotipados ou rituais para aliviar a ansiedade) (GYERTYAN, 1995; ICHIMARU *et al.*, 1995). Podemos analisar, este modelo, por dois ângulos: primeiro que medicamentos eficazes para tratar desordens obsessiva-compulsiva, como inibidores seletivos de recaptação de serotonina, reduzem o número de esferas escondidas e segundo que camundongos expostos previamente as esferas de vidro, apresentam o comportamento de enterrá-las mesmo quando já existe a experiência de que o estímulo não é ameaçador (isso é, não ocorre habituação) indicando um suposto comportamento compulsivo (GYERTYAN, 1995). Entretanto, essa hipótese é enfraquecida pelas observações de que o TOC não é sensível aos BZD e os ISRS são eficazes no Transtorno de Ansiedade Generalizada. Considerando esta última observação, para auxiliar na avaliação da atividade ansiolítica do EBHA de A.

millefolium L, foi realizado o teste de esconder esferas. Nossos resultados mostraram que independente da administração (aguda ou repetida) e da dose, o EBHA de *A. millefolium* L reduziu o comportamento defensivo dos camundongos frente ao estímulo aversivo.

Entretanto, no modelo da hipofagia emocional este efeito tipo ansiolítico não foi observado. Este resultado foi inesperado, considerando que drogas ansiolíticas aumentam a quantidade de comida ingerida ou reduzem a latência para início do consumo neste paradigma experimental e que os perfis comportamentais provocados no LCE seriam semelhantes aos da neofobia (DULAWA e HEN, 2005; BOURIN *et al.*, 2007). Nesta linha, os resultados obtidos para o diazepam, administrado agudamente, confirmam a literatura, pois drogas ansiolíticas aumentam a quantidade de comida ingerida nesse paradigma experimental (SOUBRIÉ *et al.*, 1975). Entretanto, embora este modelo seja geralmente sensível ao tratamento crônico com antidepressivos, os resultados obtidos com nomifensina (10 mg/kg), único antidepressivo com atividade dopaminérgica testado, são similares ao do EBAH da *A. millefolium*: efeito ansiogênico após administração aguda e sem efeito com tratamento repetido (BODNOFF *et al.*, 1989; DULAWA e HEN, 2005). Além disto, caso a droga testada apresente uma alteração no consumo alimentar basal (isto é, em condições de baixa ansiedade, como a caixa moradia) pode haver interferência nos resultados. Esta é uma questão importante se considerarmos que o EBHA de *A. millefolium* apresenta atividade dopaminérgica. Esta hipótese não seria, entretanto, consistente com resultados de Dalsenter *et al.* (2004) e Cavalcanti *et al.* (2006), que não observaram alteração do peso durante tratamento crônico com *A. millefolium*. Infelizmente o consumo basal não foi avaliado no presente trabalho e estudos futuros deverão abordar esta questão.

É interessante notar que o efeito ansiolítico da *A. millefolium* L foi observado nos testes do labirinto em cruz elevado e de esconder esferas, após a repetição do tratamento (25 dias), sugerindo a ausência de tolerância para esse efeito após administração a curto prazo, que é semelhante ao DZP.

Procurando excluir a possibilidade de que o tratamento com o EBHA de *A. millefolium* L pudesse influenciar o sistema motor dos animais e, conseqüentemente interferir nos resultados dos modelos adotados, os mesmos camundongos tratados foram submetidos aos testes do campo aberto, barra giratória e abdução das patas posteriores. Os resultados demonstraram que a atividade motora dos animais tratados com as diferentes doses do EBHA de *A. millefolium* L (agudo e repetido) não difere dos controles nos parâmetros comportamentais avaliados, com exceção para o teste de abdução que após administração aguda promoveu relaxamento muscular nas doses utilizadas.

No teste de abdução das patas posteriores, o EBHA de *A. millefolium* L em todas as doses administradas, agudamente, promoveu aumento da distância entre as patas de forma semelhante ao DZP. Apesar de nossos resultados, neste teste, terem mostrado relaxamento muscular, os resultados obtidos na barra giratória e no campo aberto, indicam que o tratamento com o EBHA não diminui a coordenação motora dos animais. Entre os dois testes o mais utilizado é o da barra giratória, pois permite uma melhor quantificação dos resultados e apresentam um número menor de fatores externos que interferem nos resultados, como por exemplo, a maneira de segurar o animal antes de soltá-lo sob o papel para a leitura da distância entre as patas, no teste da abdução das patas posteriores.

Portanto, o efeito do EBHA de *A. millefolium* L não foi atribuível as alterações na atividade locomotora, pois nossos resultados mostraram que não ocorreram alterações significativas nos parâmetros relacionados com atividade motora, como o número total de entradas nos braços do LCE, o número de cruzamentos no teste do campo aberto (LISTER, 1987; de CASTRO *et al.*, 2007; RAUPP *et al.*, 2008) e no número de quedas no teste da barra giratória (SOUZA *et al.*, 2004; 2005; 2007; MELO *et al.* 2006). O EBHA de *A. millefolium* L administrado agudamente promoveu redução no tempo de permanência na barra giratória apenas para o grupo tratado com a dose de 100 mg/kg, enquanto que após o tratamento repetido (25 dias) nenhuma alteração foi observada no tempo de permanência e no número de quedas da barra giratória. Esta ausência de deficiência locomotora é consistente com Pires *et al.* (2009), que também não encontraram modificação na atividade locomotora ou incoordenação motora após a administração do extrato hidroalcoólico das partes aéreas (com exceção das flores) de *A. millefolium* L. Portanto o efeito do extrato não foi atribuível as alterações na atividade locomotora, sugerindo assim que a *A. millefolium* L apresenta efeito do tipo ansiolítico, desprovido de efeito sedativo e de efeito relaxante muscular, indicando assim, um perfil de efeitos colaterais potencialmente diverso do observado com o BZD.

A busca por novas drogas ansiolíticas usando abordagens farmacológicas tenta encontrar drogas com novo mecanismo de ação. Considerando que várias substâncias com atividade ansiolítica atuam através de um aumento na função inibitória do complexo GABA/BZD, neste trabalho procuramos investigar se o efeito ansiolítico da *A. millefolium* L poderia ser decorrente de uma ação facilitadora da inibição GABAérgica. Benzodiazepínicos e antagonistas dos receptores GABA_A,

picrotoxina, ou do sítio BZD, flumazenil, têm sido usados para avaliar o envolvimento do mecanismo via complexo GABA/BZD no efeito tipo ansiolítico de diversos medicamentos e/ou substâncias (REDDY e KULKARNI, 1996; DOMBROWSKI *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2008; KAMEI *et al.*, 2009). Esta estratégia tem sido útil no estudo do mecanismo de ação de plantas com efeito ansiolítico. Por exemplo, estudos relatam que o flumazenil, em dose, que não afeta os índices de comportamento *per se*, bloqueou o efeito ansiolítico de ação de *Cymbopogon citratus* (ou seja, bloqueou o aumento do tempo gasto no compartimento claro do teste claro/escuro; COSTA *et al.*, 2011) e de *Passiflora actinina* (ou seja, bloqueou o aumento do percentual de tempo de entradas nos braços abertos do LCE; LOLLI *et al.*, 2007).

Nossos resultados mostraram que a picrotoxina não alterou o efeito tipo ansiolítico do EBHA da *A. millefolium* L em qualquer uma das medidas comportamentais de ansiedade no LCE, enquanto que flumazenil bloqueou apenas o aumento do percentual de entradas nos braços abertos. O efeito do tratamento prévio de flumazenil, um antagonista do sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, no efeito *A. millefolium* L no LCE, observado no presente estudo é intrigante porque esperávamos que os parâmetros relacionados à exploração dos braços abertos seriam alterados conjuntamente na mesma direção, como observado em outros estudos (por exemplo, LOLLI *et al.*, 2007). Além disto, esta expectativa de variação simultânea na % de entradas e de tempo nos braços abertos foi baseada na observação de que estes parâmetros são agrupados no mesmo fator nos estudos de análise fatorial do LCE (LISTER, 1987; CRUZ *et al.*, 1994; RODGERS e JOHNSON, 1995). Uma explicação para o flumazenil ter bloqueado apenas o efeito do EBHA de *A. millefolium* L na % de entradas nos braços abertos poderia ser que a dose de

flumazenil, embora embasada na literatura, tenha sido insuficiente. Entretanto, esta hipótese é pouco provável, pois em nosso estudo tanto o flumazenil quanto a picrotoxina, per se, não alteraram os percentuais de entradas e permanência nos braços abertos, quando administrados agudamente em camundongos, porém reduziram estes parâmetros quando associados ao DZP. Por outro lado, pode-se observar na literatura alguns estudos que encontraram uma discrepância similar (ou seja, um efeito significativo em apenas um dos parâmetros de exploração dos braços abertos, % entradas ou % de tempo despendido nos braços abertos) em resposta a bretazenil, ao clordiazepóxido (COLE e RODGERS, 1993), ao FG 7142 (LISTER, 1987) e ao PK 8165 (PELLOW e FILE, 1986). Nestes estudos, a conclusão foi de um efeito do tipo ansiolítico (COLE e RODGERS, 1993) ou tipo ansiogênico (PELLOW e FILE, 1986; LISTER, 1987). É interessante ainda que, diferente do observado no presente estudo, nem sempre o flumazenil bloqueia todos os efeitos do diazepam no LCE (DUARTE *et al.*, 2008). Portanto o resultado da administração de flumazenil com o EBHA da *A. millefolium* L poderia ser considerado um efeito do tipo ansiolítico, porque o percentual do tempo despendido nos braços abertos foi significativamente maior que os grupos controles. Isto sugere que, provavelmente, o efeito do EBHA da *A. millefolium* L não seja decorrente de interação com as vias de neurotransmissão GABAérgicas ou com o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Esta hipótese é reforçada pelos resultados do *binding* do sítio BZD que indicaram que a ligação do [³H]-flunitrazepam não foi alterada pelo EBHA de *A. millefolium* L (1, 10 e 100 µg/ml), enquanto que na presença de DZP, controle positivo, ocorreu redução significativa desta ligação.

Em conjunto, esses resultados sugerem que o EBHA da *A. millefolium* L pode agir através de um mecanismo complementar não-BDZ/GABA. Este é um

resultado interessante, uma vez que diferencia a *A. millefolium* L de BZD, os medicamentos ansiolíticos mais amplamente prescritos, e até mesmo de outras plantas com efeito tipo ansiolítico (HOUGHTON, 1999; CARLINI, 2003; LOLLI *et al.*, 2007; DUARTE *et al.*, 2008;. BENKE *et al.*, 2009).

Diversas substâncias foram descritas como constituintes presentes na *A. millefolium* L, entre elas os flavonóides apigenina, luteolina e rutina (BENEDEK *et al.* 2007; BENETIS *et al.* 2008). Tuberoso *et al.* (2009) mostraram que um grama de extrato bruto etanólico seco equivale aproximadamente 1mg de apigenina. Baseados nestes dados, em nosso trabalho foram utilizadas doses de apigenina que correspondem a dose de 300 mg/kg do EBHA de *A. millefolium* L.

Apigenina, em um intervalo de dose que corresponde a dose de 300 mg/kg do EBHA de *A. millefolium* L. (0,3 e 3,0 mg/kg apigenina), não exerceu qualquer efeito do tipo ansiolítico no LCE ou no teste de esconder esferas. Nossos resultados não corroboram alguns dados da literatura, que sugerem um efeito tipo ansiolítico da apigenina (3,0 mg/kg) em camundongos CF1 testados no LCE (VIOLA *et al.*, 1995). No entanto, Zanolli *et al.* (2000) e Avallone *et al.* (2000) também não observaram qualquer efeito no teste claro/escuro (apigenina 0,5 a 10 mg/kg, i.p.) e no LCE (apigenina 1 a 25 mg/kg, i.p.) em ratos Sprague-Dawley. Estes resultados contraditórios podem ser atribuídos às diferenças entre modelos animais ou espécies/linhagens empregadas. Além disso, em nosso estudo, a dose intermediária de 1,0 mg/kg de apigenina aumentou o número esferas de vidro escondidas e na maior dose (3,0 mg/kg) de apigenina ocorreu diminuição da porcentagem de entradas nos braços abertos, indicando um efeito do tipo ansiogênico. Estes resultados são consistentes com redução na latência de convulsões induzidas por

picrotoxina em animais que receberam previamente doses crescentes de apigenina (0,5 a 10,0 mg/kg) e com a redução das correntes de cloreto na atividade GABAérgica (AVALLONE *et al.*, 2000). Em condições experimentais semelhantes, a apigenina não reproduziu o efeito tipo ansiolítico do EBHA de *A. millefolium* L, indicando que a apigenina, isoladamente, não contribui para o efeito tipo ansiolítico deste extrato no presente estudo. Por outro lado, a administração de rutina, outro flavonóide presente na *A. millefolium* L, porém em quantidades menores que a apigenina, na dose intermediária (1,0 mg/kg) promoveu aumento do % de entradas nos braços abertos, o que não correu nas doses de 0,3 e 3,0 mg/kg. Já no teste de esconder esferas, independente da dose de rutina, não alterou o número de esferas escondidas quando comparado ao grupo controle. Embora estes resultados possam sugerir que a rutina apresente um efeito do tipo ansiolítico, o seu padrão comportamental nos modelos empregados é diferente do apresentado pelo EBHA de *A. millefolium* L, indicando que, isoladamente, a rutina não explica os efeitos tipo ansiolítico deste extrato. A naringenina, uma flavanona, não promoveu nenhuma alteração nos % de entradas ou tempo despendido nos braços abertos do LCE, além de, por outro lado, no teste de esconder esferas, as menores doses aumentaram o número de esferas escondidas, indicando um efeito do tipo ansiogênico. Ressalte-se que não encontramos referências na literatura sobre o uso de rutina e naringenina nos modelos estudados. Neste sentido, a rutina é uma substância que desperta interesse para futuros estudos. Considerando que tais flavonóides apresentam diferentes afinidades pelo receptor BZD, apigenina ($K_i=3 \mu\text{M}$; VIOLA *et al.*, 1995), rutina ($K_i>100 \mu\text{M}$; PALADINI *et al.*, 1999) e naringenina ($K_i>25 \mu\text{M}$; AI *et al.*, 1997), nossos resultados sugerem que o efeito tipo ansiolítico do EBHA de *A. millefolium* L não estaria relacionado com os receptores BDZ, uma vez que estes flavonóides com

menores Ki não apresentaram efeito do tipo ansiolítico, que o extrato não deslocou o [3H]-flunitrazepam no estudo de *binding* e que o flumazenil não bloqueou estes efeitos do extrato.

Após a confirmação do efeito tipo ansiolítico do EBHA de *A. millefolium* L, investigamos o possível efeito tipo antidepressivo. Os modelos animais para avaliar a depressão são diversos e foram desenvolvidos baseados nas alterações comportamentais produzidas pelo estresse, drogas ou lesões em estruturas cerebrais (CRYAN *et al.*, 2002). Para avaliar este tipo de atividade, são comumente utilizados na avaliação pré-clínica diferentes modelos, entre eles o teste de natação forçada (PORSOLT *et al.*, 1977) e o teste de suspensão pela cauda (BOURIN *et al.*, 2005), sendo que em alguns casos utilizam-se diferentes linhagens de camundongos (BOURIN *et al.*, 2005). Também são comumente utilizados os testes do desamparo aprendido (esquiva ativa de duas vias após administração de choques inescapáveis e imprevisíveis; SHERMAN *et al.*, 1982); do antagonismo dos efeitos da reserpina (COSTA *et al.*, 1960) e de estresse moderado crônico (WILLNER *et al.*, 1987). Como controles positivos utilizam-se antidepressivos como a imipramina, desipramina e flouxetina (ZHANG, 2004).

Uma grande dificuldade na utilização destes modelos animais para avaliar efeito do tipo antidepressivo, como descrito anteriormente em relação a avaliação do efeito do tipo ansiolítico, esta no fato de que certos sintomas da depressão, como: melancolia, sentimento de culpa e pensamentos suicidas, comportamentos essencialmente humanos, não podem ser replicados em animais. Willner (1997) descreveu que alguns comportamentos animais podem refletir sintomas humanos de depressão. Como, por exemplo, a anedonia (perda do prazer a estímulos

anteriormente prazerosos), que é um dos sintomas da depressão e pode ser induzida de forma similar nos animais expostos ao modelo de estresse crônico. Os modelos animais de depressão devem cumprir alguns requisitos como: ter analogia com a depressão humana na sua manifestação ou sintomas; desenvolver, no animal, uma mudança comportamental que possa ser avaliada objetivamente; estas mudanças comportamentais devem ser revertidas pelos antidepressivos utilizados em humanos e os resultados apresentarem reprodutibilidade (MCKINNEY e BUNNEY, 1969). Assim o modelo animal deve possuir validade preditiva e reprodutibilidade para que possa ser utilizado em avaliações pré-clínicas (GEYER e MARKOU; 1995).

Em nosso trabalho, utilizamos os testes da natação forçada e de suspensão pela cauda. O TNF, desenvolvido por Porsolt *et al.* (1977), tem sido o mais empregado para avaliar, pré-clinicamente, o efeito do tipo antidepressivo, devido a sua fácil utilização, grande reprodutibilidade entre os laboratórios e a habilidade de detectar um grande espectro de agentes antidepressivos (BORSINI e MELI, 1988; CRYAN *et al.*, 2002). O teste é baseado na observação de que quando os roedores são colocados em uma situação de estresse inescapável (no caso, cilindro com água sem possibilidade de fuga) eles apresentam inicialmente comportamento de fuga, gradualmente substituído por imobilidade. Drogas antidepressivas reduzem o tempo de imobilidade no teste sem alterar a atividade locomotora basal (BORSINI e MELI, 1988; CRYAN *et al.*, 2002). Apesar de detectar vários tipos de drogas antidepressivas, os resultados com drogas inibidoras seletivas da recaptação de serotonina têm sido contraditórios (CRYAN *et al.*, 2005).

O TSC é um teste muito utilizado para investigação do efeito tipo antidepressivo de compostos com ação central. Baseia-se também na observação de que os roedores, após o comportamento inicial de tentar ativamente escapar, desenvolvem uma postura de imobilidade quando colocados em uma situação de estresse inescapável (STÉRU *et al.*, 1985; BOURIN *et al.*, 2005; CRYAN *et al.*, 2005). A imobilidade é interpretada como o declínio da persistência em tentar escapar da situação estressante, através do estabelecimento de um comportamento passivo do animal (STÉRU *et al.*, 1985; CRYAN *et al.*, 2005). Considerando que drogas antidepressivas utilizadas na clínica promovem e aumentam comportamentos dos animais direcionados à tentativa de escape; a redução do tempo de imobilidade no TSC tem sido interpretada como um indicativo do efeito tipo antidepressivo em camundongos (STÉRU *et al.*, 1985; BOURIN *et al.*, 2005; CRYAN *et al.*, 2005). Este teste apresenta algumas vantagens quando comparado a outros testes, como seu baixo custo, metodologia simples e não necessitar de treinamento prévio, bem como sua habilidade em detectar os efeitos de um amplo espectro de drogas antidepressivas (BOURIN *et al.*, 2005; CRYAN *et al.*, 2005).

Apesar de certas similaridades (imobilidade frente a uma situação estressante e inescapável) o TNF e o TSC não apresentam sempre o mesmo resultado (BAI *et al.*, 2001; CRYAN *et al.* 2005) sendo interessante a utilização de ambos na avaliação de um possível efeito antidepressivo (BOURIN *et al.*, 2005). Neste sentido utilizamos para o presente estudo os dois modelos uma vez que investigamos o efeito do tipo antidepressivo do EBHA da *A. millefolium* L, desconhecido até o momento.

A administração aguda e repetida (25 dias) do EBHA de *A. millefolium* L reduziu o tempo de imobilidade no TNF em doses que não alteraram a atividade locomotora, como já descrito. Além disso, a administração crônica do EBHA de *A. millefolium* L reduziu o tempo de imobilidade no TSC. Por outro lado, diferente da imipramina, quando administrado agudamente o EBHA de *A. millefolium* L não alterou o comportamento dos animais no TSC.

O efeito anti-imobilidade da imipramina nos TNF e TSC observado no presente estudo estão em conformidade com a literatura estudada (BORSINI e MELI, 1988; CRYAN *et al.*, 2005), validando assim os procedimentos em nosso estudo.

Portanto, à primeira vista, estes resultados podem parecer contraditórios para um composto com efeito antidepressivo potencial, pois às vezes o TSC é considerado a “versão seca” do TNF (CRYAN *et al.*, 2005). Ambos os testes partilham várias semelhanças comportamentais, como o comportamento inicial de fuga, comportamento que gradualmente é substituído pela imobilidade, com alternância entre os comportamentos de imobilidade e de fuga, e finalmente cessação da alternância e prevalência do comportamento de imobilidade (BAI *et al.*, 2001; CRYAN *et al.*, 2005; LINO-DE-OLIVEIRA, 2005). Além disso, ambos os modelos são propostos como uma resposta a uma situação aversiva inescapável (BAI *et al.* 2001; CRYAN *et al.*, 2005) e vários antidepressivos reduzem a imobilidade em ambos os testes (BORSINI e MELI, 1988; CRYAN *et al.*, 2005). No entanto, resultados divergentes com estes modelos são encontrados na literatura (por exemplo, BAI *et al.*, 2001; BOURIN *et al.*, 2005). Por exemplo, alguns antidepressivos atípicos (rolipram) apresentam um resultado positivo no TNF, mas

uma resposta negativa no TSC (BAI *et al.*, 2001; CRYAN *et al.*, 2005). Além disso, há propostas que existem algumas diferenças nos substratos biológicos que medeiam o comportamento dos animais nestes modelos (BAI *et al.*, 2001; CRYAN *et al.*, 2005). Assim, a diferença no perfil comportamental apresentada no TNF e no TSC, da imipramina e do EBHA de *A. millefolium* L pode ser devido à mediação de substratos biológicos distintos.

Outro resultado que deve ser comentado é o efeito dose-resposta da administração repetida do EBHA da *A. millefolium* L no TNF, em que somente a dose mais baixa reduziu o tempo de imobilidade, sugerindo uma forma de curva dose-resposta em U (infelizmente a curva em U não está completa, pois não foi testada nenhuma dose menor que 30 mg/kg). Isto também é observado com tratamentos de outras drogas, tais como drogas nitrinégicas (Da SILVA *et al.*, 2000) e outros extratos de plantas (ZHANG *et al.*, 2002; EL-ALFY *et al.*, 2010), mas a razão para este padrão ainda é desconhecida. Uma possibilidade é que um dos componentes do extrato pode antagonizar o efeito antidepressivo do suposto princípio ativo. Estudos futuros com diferentes frações do EBHA da *A. millefolium* L ajudarão a esclarecer esta questão. No entanto, esse padrão não foi observado no TSC.

Nos últimos anos os efeitos centrais de diferentes flavonóides têm sido associados ao seu envolvimento em sistemas cerebrais de neurotransmissão serotoninérgica (YU *et al.*, 2007; AN *et al.*, 2008; GRUNDMANN *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008) e talvez isso se deva ao fato de que durante muitos anos as pesquisas com substâncias isoladas e/ou extratos estiveram mais centradas nos eventos envolvendo o neurotransmissor GABA, o principal

neurotransmissor inibitório do SNC, enquanto os estudos com substâncias isoladas envolvendo as vias de neurotransmissão serotoninérgica têm crescido nos últimos tempos (DEAKIN *et al.*, 1992; DAVIDSON E STANFORD, 1995; GRAEFF *et al.*, 1996; BARNES E SHARP, 1999; SENA *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2008; BELMAKER, 2008; CHRISTMAS *et al.*, 2008; FONE, 2008; BARNES *et al.*, 2009).

Nossos resultados, quando analisados em conjunto, sugerem um efeito do tipo antidepressivo do EBHA de *A. millefolium* L. Embora a administração repetida do EBHA alterou os níveis de serotonina (5-HT) no estriado, a alteração mais consistente induzida pelo EBHA foi o aumento nos níveis de dopamina, que ocorreu no córtex pré-frontal e hipocampo. Assim, o efeito anti-imobilidade da *A. millefolium* L, provavelmente, estaria mais associado a uma ação dopaminérgica. Este é um resultado interessante, pois medicamentos antidepressivos pró-dopaminérgicos apresentam algumas vantagens sobre medicamentos noradrenérgicos /serotoninérgicos, como a melhora na sonolência, fadiga excessiva e retardo psicomotor (PAPAKOSTAS, 2006).

As doses de 30 e 300 mg/kg do EBHA de *A. millefolium* L do presente estudo correspondem a doses humanas de 2,43 e 24,3 mg/kg, respectivamente (REAGAN-SHAW *et al.*, 2008). Considerando-se uma pessoa com 70 kg de peso corporal, estas doses correspondem a 170 mg e 1,7 g, respectivamente. Estas doses estão perto do que é recomendado pela Agência Europeia de Medicamentos para uso oral da *A. millefolium* L, que é de 2 g em 250 ml (infusão), uma ou duas vezes por dia (AGÊNCIA EUROPEIA DE MEDICAMENTOS, 2011). Portanto, as doses que promoveram efeitos do tipo ansiolítico e antidepressivo no presente estudo são semelhantes às utilizadas na preparação tradicional.

É importante observar que o EBHA de *A. millefolium* L demonstrou boa segurança em estudos pré-clínicos (DALSENTER *et al.*, 2004; CAVALCANTI *et al.*, 2006.), o que reforça o interesse no seu potencial para o desenvolvimento de um novo antidepressivo. Além disso, considerando que uma das queixas mais frequentes dos pacientes que fazem uso de antidepressivos inibidores da recaptação de serotonina, são as dores gastrointestinais (PAPAKOSTAS, 2010), o efeito gastroprotetor observado com o extrato de *A. millefolium* L também é interessante (CAVALCANTI *et al.*, 2006; POTRICH *et al.*, 2010).

Em conclusão, os resultados indicam que:

- 1- O EBHA de *A. millefolium* L utilizado neste trabalho apresenta, qualitativamente, flavonóides de diferentes classes.
- 2- O EBHA de *A. millefolium* L, administrado aguda e repetidamente, apresenta efeito do tipo ansiolítico
- 3- O efeito do tipo ansiolítico provavelmente não é mediado por receptores GABA_A/BDZ.
- 4- O EBHA de *A. millefolium* L apresentou um efeito do tipo antidepressivo, possivelmente mediado por mecanismos monoaminérgicos (p.ex. dopaminérgico).

Diante destes resultados e considerando que a *A. millefolium* L apresenta baixa toxicidade, esta planta pode ser uma promissora candidata para o desenvolvimento de um novo fitofármaco.

ACHER, J. 1973. Test for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, 21:205-235.

AGÊNCIA EUROPÉIA DE MEDICAMENTOS. 2011. Assessment report on *Achillea millefolium* L.

EMA/HMPC/149343/2010. Available at: http://www.ema.europa.eu/docs/en_G/document_library/HerbalHMPC_assessment_report/2011/09/WC500115467.pdf Accessed November 10, 2011.

AI, J.; DEKERMENDJIAN, K.; WANG, X.; NIELSEN, M.; WITT, M.R. 1997. 6-Methylflavone, a benzodiazepine receptor ligand with antagonistic properties on rat brain and human recombinant GABA_A receptors in-vitro. **Drug Dev. Res.** 41:99-108.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico a farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacogn** 16 (Supl.): 678-689.

ALJANCIC, I., VAJS, V., MENKOVIC, N., KARADZIC, I., JURANIC, N., MILOSAVLJEVIC, S., MACURA, S., 1999. Flavones and sesquiterpene lactones from *Achillea atrata* subsp. *multifida*: antimicrobial activity. **J Nat Prod** 62(6):909-911.

ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; POLARI, R.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; de ARAÚJO, C.C. 1999. Method to evaluate the efficacy of some plants on the central nervous system. **Rev Bras Farm** 80(3/4):72-76.

ALMEIDA, R.N.; NAVARRO, D.S.; BARBOSA-FILHO, J.M. 2001. Plants with central analgesic activity. **Phytomedicine** 8: 310-322.

ALONSO, J.R. 1998. **Tratado de fitomedicina**. Buenos Aires: Isis, p.725-729.

ANDERSON, I.M.; McKIE, S.; ELLIOTT, R.; WILLIAMS, S.R.; DEAKIN, J.F. 2008. Assessing human 5-HT function in vivo with pharmacMRI. **Neuropharmacol.** v.55, n.6, p.1029-1037.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; ZORZETTO FILHO, D. 2001. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr** 23: 233-242.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; VITAL, M.A.B.F. Modelos animais em Psicofarmacologia. In: ALMEIDA, R.N. (Org.). Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 154-160.

AN, L.; ZHANG, Y.; YU, J.; LIU, X.; ZHAO, N.; YUAN, L.; CHEN, H.; LI, Y. 2008. The total flavonoids extracted from Xiaobuxin-Tang upregulate the decreased hippocampal neurogenesis and neurotrophic molecules expression in chronically stressed rats. **Prog- Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.**, v.32, n.6, p.1484-1490.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 24/10/2010.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20/12/2011.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br>. Acesso em: 17/01/2012

ANVISA – Nota Técnica do Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, 2010.

ANVISA – RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos Fitoterápicos.

ANVISA - RESOLUÇÃO DE DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre notificação de drogas vegetais.

APPLEQUIST, W.; MOERMAN, D.E. 2011. Yarrow (***Achillea millefolium*** L.): A Neglected Panacea?: A review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research. **Economic Botany**, 65 (2), p. 209-225.

AVALLONE, R.; ZANOLI, P.; PUJA, G.; KLEINSCHNITZ, M.; SCHREIER, P.; BARALDI, M. 2000. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochemic. Pharmacol.** 59, 1387-1394.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO, S. B. 2007. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusão de plantas medicinais. **Braz J Pharmacogn** 17(3): 444-447, jul/set.

BAI, F.; LI, X.; CLAY, M.; LINDSTROM, T.; SKOLNICK, P. 2001. Intra and interstrain differences in models of "behavior despair". **Pharmacol Biochem Behav.** 70:187-192.

BALMÉ, F. 1982. **Plantas Medicinais**. São Paulo: Hemus, p. 252-253.

BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; OLIVEIRA, R.A.G.; PAULO, M.Q.; TROLIN, G.; CUNHA, E.V.L.; ATAIDE, J.R. & BHATTACHARYYA, J. 1991. Chemical and Pharmacological Investigation of *Solanum* Species of Brazil – A Search for Solasodine and Other Potentially Useful Therapeutic Agents. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 86(supl.II): 189 – 191.

BARETTA, I.P.; FELIZARDO, R.A.; BIMBATO, V.F.; GASPAROTTO JÚNIOR, A.; KASSUYA, C.; ANDREATINI, R. 2009. The putative anxiolytic and antidepressant-like effect of *Achillea millefolium* L. extract in mice. **European Neuropsychopharmacology** 19(Suppl. 3): S610-S611

BARNES, T.R.; KIDGER, T.; GREENWOOD, D.T. 1979. Viloxazine and migraine. **Lancet**. Dec 22-29; 2(8156-8157):1368.

BARNES, N.M.; SHARP, T. 1999. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacol.**, v.38, p.1083-152.

BARNES, N.M.; HALES, T.G.; LUMMIS, S.C.; PETERS, J.A. 2009. The 5-HT₃ receptor--the relationship between structure and function. **Neuropharmacol.** 56(1):273-84.

BASTIANETTO, S., BROUILLETTE, J., QUIRION, R., 2007. Neuroprotective effects of natural products: interaction with intra- cellular kinases, peptides and a possible role for transthyretin. **Neurochem. Res.** 32, 1720–1725.

BELMARK, R.H. 2008. The future of depression psychopharmacology. **CNS Spectr.**, v.13, n.8, p.682-687.

BENEDEK, B.; GEISZ, N.; JAGER, W.; THALHAMMER, T.; KOPP B. 2006. Choleric effects of yarrow (*A. millefolium* s.l.) in the isolated perfused rat liver. **Phytomedicine** 13: 702–706.

BENEDEK, B.; KOPP, B.; MELZIG, M.F. 2007. *Achillea millefolium* L. – Is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? **J. Ethnopharmacol** 113: 312–317.

BENEDEK, B.; GJONCAJ. N.; SAUKEL, J.; KOOP, B. 2007b. Distribution of phenolic compounds in middle European taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. **Chem Biodivers** 4: 849-857.

BENEDEK, B. 2007. *Achillea millefolium* L. s.l. – Analysis of Phenolic Compounds and Biological Testing. PhD thesis, University of Vienna

BENETIS, R.; RADUSIENE, J.; JANULIS, V. 2008. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* wild populations in Lithuania. **Medicina (Kaunas)** ;44(10).

BENKE, D.; BARBERIS, A.; KOPP, S.; ALTMANN, K.H.; SCHUBIGER, M.; VOGT, K.E.; RUDOLPH, U.; MÖHLER, H. 2009. GABA-A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. **Neuropharmacol.** 56, 174-181.

BERTON, OI; NESTLER, E.J. 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. **Nature Reviews Neuroscience** 7, 137-151.

BIAVATTI, M.W.; MARENSI, V.; LEITE, S.N.; REIS, A. 2007. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Rev Bras Farmacogn** 17: 640-653.

BLUMENTHAL, M. BUSSE, W.R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; RIGGINS, C.W.; RISTER, R.S. 2000. Yarrow. In: **Herbal Medicine Expanded Commission e Monographs**. Integrative Medicine Communications, Boston, p. 419-423.

BODNOFF, S.R.; SURANYI-CADOTTE, B.; QUIRION, R.; MEANEY, M.J.; 1989. A comparison of the effects of diazepam versus several typical and atypical antidepressant drugs in an animal model of anxiety. **Psychopharmacol.** 97, 277–279.

BORSINI, F.; MELI, A. 1988. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacol.** 94, 147–160.

BOSWELL-RUYS, C.L.; RITCHIE, H.E.; BROWN-WOODMAN, P.D. 2003. Preliminary screening study of reproductive outcomes after exposure to yarrow in the pregnant rat. **Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.** Austrália, v. 5, n. 68, p. 416-420.

BOURIN, M.; PETIT-DEMOULIÈTE B.; DHONNCHADHA, B.N.; HASCÖET, M. 2007. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, p.567-574.

BOURIN, M.; CHENU, F.; RIPOLL, N.; DAVID, D.J.P. 2005. A proposal of decision tree to screen putative antidepressants using forced swim and tail suspension tests. **Behavioral Brain Res.**, v. 164, p.266-269.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** 72: 248-54.

BRADLEY, P.R. 1992. British herbal compendium. v.1. Bournemouth: **British Herbal Medicine Association**, p. 190-191.

BROEKKAMP, C.L.; RIJK, H.W.; JOLY-GELOUIN, D.; LLOYD, K.L. 1986. Major tranquillizers can be distinguished from minor tranquillizers on the basis of effects on marble burying and swim-induced grooming in mice. **Eur J Pharmacol** 126: 223–229.

BRUNETON, J. 1999. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants** (2nd edn.), Lavoisier Publishing: Paris; 337–339.

BUTLER, M.S. 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153.

BUTTERWECK, V., PETEREIT, F., WINTERHOFF, H., NAHRSTEDT, A., 1998. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Med.** 64, 291–294.

BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G; NAHRSTEDT, A; WINTERHOFF, H. 2000. Flavonoids from *Hypericum perforatum* Show Antidepressant Activity in the Forced Swimming Test. **Planta Med.** 66(1): 3-6.

CÁCERES, A. 1999. Plantas de uso medicinal na Guatemala. **Guatemala: Ed. Universitária**. Reimpressão da 1 ed. 1996, p. 268-270.

CALIXTO, J.B. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.** Aug 22; 100 (1-2):131-4.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JR., J.M. 2008. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**. V. 78, supl. 1, p.98-106.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A.; AKPULAT, H. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and

methanol extracts of *A. millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **J Ethnopharmacol** 87: 215–220.

CARLINI, E.A. 2003. Plants and the central nervous system. **Pharmacol Biochem Behav** 75(3): 501-12.

CARLINI, E.A.; RODRIGUES, E.; MENDES, F.R.; TABACH, R.; GIANFRATTI, B. 2006. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Rev. Bras. Farmacogn** 16:690-695.

CAROBREZ, A.P.; BERTOGLIO, L.J. 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, vol. 29, n.8., p.1193-1205.

CARVALHO, A.C.B.; BALBINO, E.E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J.P.S. 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev Bras. Farmacognosia**. V. 18, n.2, p.314-319.

CASTRO, J. L. de. 1981. Medicina vegetal: teoria e prática conforme a naturoopatia. Lisboa: **Publicações Europa-América**, p. 225-227.

CAVALCANTI, A.M. 2002. Determinação da toxicidade pré-clínica do extrato aquoso bruto das partes aéreas isentas de inflorescências de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) em ratos. 205 f. Curitiba. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

CAVALCANTI, A.M.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; DE SOUSA, R.S.; DA SILVA-SANTOS, J.E.; MESIA-VELA, S.; MARQUES, M.C. 2006. Safety and antiulcer efficacy studies of *A. millefolium* L after chronic treatment in Wistar rats. **J Ethnopharmacol** 107(2):277-84

CHANDLER, R.F. 1989. Yarrow; Herbal medicine. **Janvier**, p. 41-3, jan.

CHANDLER, R.F.; HOOPER, S.N.; HOOPER, D.L.; JAMIESON, W.D.; FLINN, C.G.; SAFE, L.M., 1982. Herbal remedies of the Maritime Indians: sterols and triterpenes of *Achillea millefolium* L. (yarrow). **J Pharm Sci** 71(6):690-693.

CHRISTMAS, D.; HOOD, S.; NUTT, D. 2008. Potential novel anxiolytic drugs. **Curr. Pharm. Des.** v.14, n.33.

COLE, J.C.; RODGERS, R.J. 1993. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behav Pharmacol.** 4, 573-580.

CORRÊA, A.D.; BATISTA, R.S.; QUINTAS, L.E.M. 2001. Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica. 4 ed. **Petrópolis: Vozes**, p. 164-165.

CORRÊA JUNIOR, C.; GRAÇA, C.; SCHEFFER, M.C. 2000. Produção de plantas medicinais para programas de fitoterapia em rede de saúde pública: a experiência de Curitiba – Pr. **Hortic Bras.**, v. 18, p. 48-50, jul.

CORRÊA JUNIOR, C.; MING, L.C.; SCHEFFER, M.C. 1994. Cultivo de plantas medicinais, aromáticas e condimentares. 2. ed. **Jaboticabal: FUNEP**. p. 162.

COSTA, E.; GARATTINI, S.; VALZELLI, L. 1960. Interactions between reserpine, chlorpromazine and imipramine. **Experiencia**, 16:461-463.

COSTA, C.A.; KOHN, D.O.; de LIMA, V.M.; GARGANO, A.C.; FLÓRIO, J.C.; COSTA, M. 2011. The GABAergic system contributes to the anxiolytic-like effect of essential oil from *Cymbopogon citrates* (lemongrass). **J. of Pharmacol.** 137. 828-836.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. 1999. Discovery and Development of Antineoplastic Agents from Natural Sources. **Cancer Investigation**, 17, n. 2, p. 153-163.

CRYAN, J.F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. 2005. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. 2005. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, n. 29, p. 571-625.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacol. Sci.**, 23 (5):238-245.

CRUZ, A.P.; FREI, F.; GRAEFF, F.G. 1994. Ethopharmacology analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. **Pharmacol. Biochem and Behav.** 49,171-176.

CSUPOR-LOFFLER, B., HAJDU, Z., ZUPKO, I., RETHY, B., FALKAY, G., FORGO, P., HOHMANN, J., 2009. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines. **Phytother Res** 23(5):672-676.

CUBA. Ministério de Salud Publica. 1993. Fitomed II: plantas medicinais. Habana: **Ciências Médicas**, p.82-84.

CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS, H.O.G.; SENA, A.A.S.; LINO JUNIOR, R.S. 2009. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato bruto etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev. Bras. Farmacognosia**. V. 19, n.2ª, p. 403-411.

DALSENTER, P.R.; CAVALCANTI, A.M.; ANDRADE, A.J.; ARAUJO, S.L.; MARQUES, M.C. 2004. Reproductive evaluation of aqueous crude extract of *A. millefolium* L. (Asteraceae) in Wistar rats. **Reprod Toxicol** 18(6):819-23.

DALVI, A.; RODGERS, R. J. 1996. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. **Psychopharmacology**, 128: 380-397.

Da SILVA, G.D., MATTEUSSI, A.S.; DOS SANTOS, A.R.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L. 2000. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced

swimming test and in the tail suspension test in mice. **Neuroreport**. 11(17): 3699-3702.

DAVIDSON, C. S; STAMFORD, J.A. 1995. Evidence that 5-hydroxytryptamine release in rat dorsal raphe nucleus is controlled by 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} autoreceptors. **Brit. J. Pharmacol.** v.114, p.1107-1109.

DAWSON, G.R., TRICKLEBANK, M.D., 1995. Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents. **Trends Pharmacol. Sci.** 16, 33–36.

DEAKIN, J.F.; GRAEFF, F.G.; GUIMARÃES, F.S. 1992. 5-HT receptor subtypes and the modulation of aversion. In: MARSDEN, C.A.; HEAL, D.J. (Eds.) Central serotonin receptors and psychotropic drugs. Oxford: Blackwell Scientific Publications, p.147-174.

De CASTRO, P.C.; HOSHINO, A.; DA SILVA, J.C.; MENDES, F.R. 2007. Possible anxiolytic effect of two extracts of *Passiflora quadrangularis* L. in experimental models. **Phytother Res** 21(5): 481-484.

DECRETO nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2006. <http://www.mda.gov.br/saf/arquivos/0950311774.doc>, acesso em junho de 2009.

DELLA LOGGIA, R. 1992. Anti-inflammatory principles from *Achillea asplenifolia* an *Achillea pratensis*. **Planta Médica**, v. 58, suppl. Issue 1, A641-A642.

De SOUZA, P.; GASPAROTTO, A. JR.; CRESTANI, S.; STEFANELLO, M.É.; MARQUES, M.C.; DA SILVA-SANTOS, J.E.; KASSUYA, C.A. 2011. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) in rats. **Phytomedicine**. 18(10): 819-25.

Di CARLO, G.; BORRELI, F. ERNEST, E. IZZO, A.A. 2001. St John's wort: prozac from the plant kingdom. **Trends Pharmacol Sci.** 22(6):292-297.

DOMBROWSKI, P.A.; FERNANDES, L.H.; ANDREATINI, R. 2006. Picrotoxin blocks the anxiolytic-and panicolytic-like effects of sodium valproate in the rat elevated T-maze. **Europ. J. of Pharmacol.**, 537, 72-76.

DUARTE, F.S.; MARDER, M.; HOELLER, A.A.; DUZZIONI, M.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; DE LIMA, T.C. 2008. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in rodents: in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacol.** (Berl). 197, 351-360.

DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J.Am. Pharm. Assoc.** v.46, n.3, p.208-209.

DUKE, J. A. 1987. Handbook of medicinal herbs. 4. ed. **Flórida: CRC Press**, p. 9-10.

DUKE, J.A. 1992. Handbook of biologically active phytochemicals and their activities. **Flórida: CRC Press**, p. 183.

DULAWAA, S.C; HENA, R. 2005. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects: The novelty-induced hypophagia test. **Neurosc. and Biobeh. Reviews** 29: 771–783.

EDWARDS, P.M; PARKER, V.H. 1977. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 40: 589-591.

EL-ALFY, A.T.; IVEYA, K.; ROBINSONA, K.; AHMEDB, S.; RADWANB, M.; SLADE, D.; KHAN, I.; ELISOHLY, M.; ROSS, S. 2010. Antidepressant-like effect of delta9-tetrahydrocannabinol and other cannabinoids isolated from *Cannabis sativa* L. **Pharmacol Biochem Behav.** 95(4): 434-442.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. 2001: Fitoterapia: na atenção primária à saúde. São Paulo: Manole, 163p.

ELISABETSKY, E. 2002. Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug action. In: Iwu MM, Wootton J, editors. **Ethnomedicine and drug**

discovery. Amsterdam: Elsevier Science BV; 2002. p.133-44. (Series 1 Advances in phytomedicine).

ERNEST, E. 2006. Herbal remédios for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine** 13: 205-208.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 2005. Council of Europe: Strasbourg; 2159–2160.

FALK, A. J.; BAUER, L.; BELL, C.L.; SMOLENSKI, S.J. 1974. The constituents of the essential oil from *Achillea millefolium* L. **Lloydia**, v. 37, n.4, p. 599-602.

FARNSWORTH, N.R. 1997. Testando plantas para novos remédios. In: E.O. Wilson (ed.). **Biodiversidade**. Rio de Janeiro, Nova Fronteira.

FAUSTINO, T.T.; ALMEIDA, R.B.; ANDREATINI, R. 2010. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Rev Bras Psiquiatr**. V. 32, n.4, p. 429-436.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M. de O.; RODRIGUES, R.A.F. 2007. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. Construindo a História dos Produtos Naturais, **MulticCiência**, vol. 7, outubro.

FONE, K.C. 2008. An update on the role of the 5-hydroxytryptamine receptor in cognitive function. **Neuropharmacol**. v.55, n.6, p.1015-1022.

FONT QUER, P. 1985. Plantas medicinales: el Dioscórides renovado. 9. ed. Barcelona. **Labor**, p. 803-805.

FONT QUER, P. 1988. Plantas Medicinales: el Discórides renovado. **Labor**: Calábria.

FRANCO, L.L. 1996. As sensacionais 50 plantas medicinais, campeãs de poder curativo. V. 1. Curitiba: Santa Mônica, p 183-185.

FRANCO, L.L. 2003. Doenças tratadas com plantas medicinais. 2ª ed. Rio de Janeiro (RJ): Vozes.

GARCIA, M.D. PUERTA, R. MARTINEZ, S. SAENZ, N.T. 1997. Analgesic, antipyretic and antiinflammatory effects of *Achillea ageratum*. **Phytother Res**; 11(5):376-9.

GAVIOLI, E.C.; DUARTE, F.S.; GUERRINI, R.; CALO, G.; RAE, G.A.; DE LIMA, T.C.M. 2008. GABAA signalling is involved in N/OFQ anxiolytic-like effects but not in nocistatin anxiogenic-like action as evaluated in the mouse elevated plus maze. **Peptides** 29: 1404 – 1412.

GBI RESEARCH, 2010. Increase in aging population of developed countries is driving the pharmaceutical industry towards Growth. Karket Publishers. 03 dez. 2010. Disponível em: <<http://marketpublishers.com/lists/8745/news.html>>. acesso em fevereiro de 2011.

GEYER, M.A.; MARKOU, A. 1995. Animal models of psychiatric disorders. In: Bloom, FE.; Kupfer, DJ., editors. **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. Raven Press; p.787-798.

GLASL, S.; MUCAJI, P.; WERNER, I.; PRESSER, A.; JURENITSCH, J. 2002. Sesquiterpenes and flavonoid aglycones from a Hungarian taxon of the *Achillea millefolium* group. **Z Naturforsch C**, 57(11-12): 976-982.

GOBBO-NETO, B.N.; LOPES, N.P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381.

GRAEFF, F.C.; VIANA, M.B.; TOMAZ, C. 1993. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. **Braz J Med Biol Res**; 23:67-70.

GRAEFF, F.G.; VIANA, M.B.; MORA, P.O. 1996. Regulation by Dorsal Raphe Nucleus 5-HT Pathways of Two Types of Fear in the Elevated Tmaze. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.53, n.1, p.171-177.

GRUNDMANN, O.; WANG, J.; MCGREGOR, G.P.; BUTTERWECK, V. 2008. Anxiolytic activity of a phytochemically characterized *Passiflora incarnata* extract is mediated via the GABAergic system. **Planta Med.**, v.74, n.15, p.1769-1773.

GUARRERA, M.; TURBINO, L.; REBORA, A. 2001. The anti-inflammatory activity of azulene. **J. Eur. Acad. Dermatol Venereol.** 15: 486-487.

GUÉDON, D., ABBE, P., LAMAISSON, J.L., 1993. Leaf and flower head flavonoids of *Achillea millefolium* L. Subspecies. . **Biochem Syst Ecol** 21(607-611).

GUPTA D.; BLEAKLEY B.; GUPTA, R.K. 2008. Dragon's blood: Botany, chemistry and therapeutic uses. **J Ethnopharmacol** 115: 361-380.

GURIB-FAKIN, A. 2006. Review – Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecul. Aspec. of Medic.** V.27, p1-93.

GYERTYAN, I., 1995. Analysis of the marble burying response: marbles serve to measure digging rather than evoke burying. **Behav Pharmacol** 6, 24– 31.

HAIDARA, K. ZAMIR, L. SHI, Q.W. BATIST, G. 2006. The flavonoid casticin has multiple mechanisms of tumor cytotoxicity action. **Cancer Lett**; 242(2):180-90.

HALBERSTEIN, R.A. 2005. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Ann Epidemiol**; 15(9):686-99.

HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETMANN, K. 1991. Search for new drugs of plant origin. **Advances in Drug Res**, 20, p.167-169.

HAMEL, P. B.; CHILTOSKEY, M. U. 1975. Cherokee plants. **Herbal Publishing Co.** p. 62.

HANDLEY, S. L. and MITHANI, S. 1984. Effects of alfa2-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. **Naunyn Schmiedeberg's Arch of Pharmacol**, 327: 1-5.

HARVEY, L.A. 2008. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, n.19/20, p.894-901.

HEINRICH, M.; ROBLES, M.; WEST, J.E.; ORTIZ DE MONTELLANO, B.R.; RODRIGUEZ, E. 1998. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). **Annu Rev. Pharmacol Toxicol**. 38: 539-565.

HELLIÓN-IBARROLA, M.C.; IBARROLA, D.A.; MONTALBETTI, Y.; KENNEDY, M.L.; HEINICHEN, O.; CAMPUZANO, M.; TORTORIELLO, J.; FERNÁNDEZ, S.; WASOWSKI, C.; MARDER, M.; De LIMA, T.C.; MORA, S. 2006. The anxiolytic-like effects of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke (Verbanaceae) in mice. **J. Ethnopharmacol**. 105: 400-408.

HERRICK, J.W. 1977. Iroquois medical botany. **Ann Arbor**, MI: University Microfilms International, p. 470.

HOFMANN, L.; FRITZ, D.; NITZ, S.; KOLLMANNNSBERGER, H.; DRAWERT, F. 1992. Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* "complex". **Phytoch**, v. 31, n. 2, p. 537-542.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. 2003. A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. **Série de textos da Escola de Verão em Química-IV**. São Carlos, SP, EdUFSCar, cap. 3 e 4.

HOUGHTON, P.J., 1999. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. **J. of Pharmacy and Pharmacol**. 51, 505-12.

ICHIMARU, Y., EGAWA, T., SAWA, A., 1995. 5-HT_{1A} Receptor subtype mediates the effect of fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, on marble-burying behavior in mice. **Japanese J of Pharmacol** 68, 65–70.

IMAMURA, M., PRASAD, C., 1998. Increased GABA-gated chloride ion influx in the hypothalamus of low-anxiety rats. **Physiol. Behav.** 64, 415–417.

INNOCENTI, G. VEGETO, E. DALL'ACQUA, S. CIANA, P. GIORGETTI, M. AGRADI, E.; SOZZIB, A.; FICOC, G.; TOME, F. 2007. In vitro estrogenic activity of *Achillea millefolium* L. **Phytomedicine**;14(2-3):147-52.

JACOBSON, L.H.; CRYAN, J.F. 2007. Feeling strained ? Influence of genetic background on depression-related behavior in mice: a review. **Behav. Genet.**, v.37, p-171-213.

JENSEN, A.G., HANSEN, S.H., NIELSEN, E.O., 2001. Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. **Life Sci.** 68, 1593–1605.

KAMBOJ, V.P. 2000. Herbal medicine. **Curr Sci.**, 78:35-9.

KAMEI, J.; MIYATA, S.; OHSAWA, M. 2009. Involvement of the benzodiazepine system in the anxiolytic-like effect of Yokukansan (Yi-gan san). **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** 33(8):1431-7.

KASTNER, U., SOSA, S., TUBARO, A., BREUER, J., RÜCKER, G., DELLA LOGGIA, R., JURENITSCH, J., 1993. Anti-edematous activity of sesquiterpene lactones from different taxa of the *Achillea millefolium* group. **Planta Medica** 59, A669.

KELLY, A.E. 1993. Locomotor activity and exploration. In: **Behavioural Neuroscience: a Practical Approach**. Oxford: Ed. A. Sahgal, 2:121.

KOROLKOVAS. A. 1996. A riqueza potencial de nossa flora. **Rev Bras Farmacogn** 1: 1-7.

KOCEVAR, N.; GLAVAC, I.; INJAC, R.; KREFT, S. 2008. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *A. millefolium*. **J Pharm Biomed Anal** 46: 609–614.

KONYALIOGLU, S.; KARAMENDERES, C. 2005. The protective effects of *A. millefolium* L. species native in Turkey against H₂O₂-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. **J Ethnopharmacol** **102**: 221–227.

KUDRZYCKZ-BIELOSZABSKA, F.; GLOWNIAK, K. 1996. Pharmacodynamic properties of oleum chamomillae and oleum millefolli. **Dissert Pharmac Pharmacol**, v. 18, n. 5, p. 449-454.

LEE, S.J.; CHUNG, H.Y.; MAIER, C.G.A.; WOOD, A.R.; DIXON, R.A.; MABRY, T.J. 1998. Estrogenic flavonoids from *Artemisia vulgaris* L. **J. Agric Food Chem** **46**: 3325-3329.

LEI AROUCA - nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. <http://www.mct.gov.br> acesso em fevereiro de 2010.

LEITE, J.R.; SIQUEIRA, J. de S. Métodos para avaliar drogas ansiolíticas. In: ALMEIDA, R.N. (Org.). Psicofarmacologia: fundamentos práticos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 154-160.

LEMMENS-GRUBER, R. MARCHART, E. RAWNDUZI, P. ENGEL, N. BENEDEK, B. KOPP, B. 2006. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea-pig ilea. **Arzneimittelforschung**; **56**(8):582-8.

LeSTRANGE, R. 1977. A History of Herbal Plants. **Londres: Angus & Robertson**.

LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. 1980. Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics. 2. ed. **Nova Iorque: John Wiley & Sons**, p. 1654.

LINO-DE-OLIVEIRA, C.; DE LIMA, T.C.M; CAROBREZ, A.P. 2005. Structure of the rat behaviour in the forced swimming test. **Behav Brain Res**. **158**(2): 243-250.

LISTER, R.G. 1987. The use of a plus maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacol**. **92**: 180 -185.

LISTER, R.G. 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther** 46(3):321-40.

LOLLI, L.F.; SATO, C.M.; ROMANINI, C.V; VILLAS-BOAS, L. de B.; SANTOS, C.A.; de OLIVEIRA, R.M. 2007. Possible involvement of GABA A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. **J. of Ethnopharmacol.** 111, 308-314.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil. Nativas e exóticas. Ed., SP: Nova Odessa, **Instituto Plantarum da Flora Ltda.** p.129-130.

MACHADO, D.G.; BETTIO, L.E.B.; CUNHA, M.P.; SANTOS, A.R.S.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; RODRIGUES, A.L.S. 2008. Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the serotonergic and noradrenergic systems. **Eur. J. Pharmacol.**, v.587, p.163-168.

MANDEL, S.A.; AMIT, T.; WEINREB, O.; REZNICHENKO, L.; YODIM, M.B. 2008. Simultaneous manipulation of multiple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases CNS. **Neurosci. Ther.** 14, 352–365.

MARKHAM, K. R.; RYAN, K. G.; BLOOR, S. J.; MITCHELL, K. A. 1998. An increase in luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. **Phytochemistry** 48:791-794.

MARQUES, L.C.; GALVÃO, S.M.P. ESPÍNOLA, E. 2004. Psychopharmacological assessment of *Pfaffia glomerata* roots (extract BNT-08) in rodents. **Phytother Res** 18: 566-572.

MARTIN P. 1998. Animal models sensitive to anti-anxiety agents. **Acta Psychiatr Scand**; 98(suppl 393):74-80.

MARTINS, E.R. CASTRO, D.M. CASTELLANI, D.C. DIAS, J.E.; 2000. **Plantas medicinais.** Viçosa: UFV, p. 150-152.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 1ª ed. Fortaleza, Edições UFC, 1998.128p.

McKINNEY, W.T; BUNNEY, W.E. 1969. Animal model of depression: review of evidence and implications for research. **Arch Gen Psychiatry**. 21: 240-248.

MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.O; LIMA, V.T.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.F; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUZA, F.C.F. 2006. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-benzoyl-tyranine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol Pharm Bull**. 29: 451-454.

MILLER, F.M., CHOW, L.M., 1954. Alkaloids of *Achillea millefolium* L. I. Isolation and characterization of achilleine. **J Americ. Chem. Society** 76(1353-1354).

MITTE, K.; NOACK, P.; STEIL, R.; HAUTZINGER, M. 2005. A meta-analytic review of the efficacy of drug treatment in generalized anxiety disorder. **J Clin Psychopharmacol** 25: 141-150.

MITICH, L.W. 1990. Yarrow – The herb of Achilles. **Weed Technology**, v.4, n.2, p.451-455.

MOLINA-HERNANDEZ, M.; TELLEZ-ALCANTARA, N.P.; DIAZ, M.A.; PEREZ GARCIA, J.; OLIVERA LOPEZ, J.I.; JARAMILLO, M.T.; 2004. Anticonflict actions of aqueous extracts of flowers of *A. millefolium* L. vary according to the estrous cycle phases in Wistar rats. **Phytother Res** 18(11): 915-20.

MONTANARI, T.; CARVALHO, J. E.; DOLDER, H. 1998. Antiespermatogenic effect of *Achillea millefolium* L. In mice. **Contraception**. v. 58, n.5, p. 309-13.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. 2001. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Quim. Nova**, v.24, n.1.

MONTGOMERY, K.C. 1955. The relation between fear induced by móvel stimulation and exploratory behavior. **J. Comportmental. Physiol. and Psychol**, v 48, p 254-260.

MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. 2000. Plant natural products active against snake bite – the molecular approach. **Phytoch.**, v.55, p. 627-642.

MS – Ministério da Saúde – Disponível em:

<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf/>. Acesso em 21/09/2010.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod**, v. 70, p. 461-477.

NEGRI, G. 1979. Descrizione e proprietà delle piante medicinali e velenose della flora Italiana. **Erbario Figurato Milano**: Urico Hoepli.

NJUNG'E, K.; HANDLEY, S.L. 1991. Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. **Pharmacol Biochem Behav** 38: 63–67.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. 1999. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, geográficos, legais e éticos, Apud: Simões, O.M.C; Schenkel, R.P; Gosmann G; Mello, P.C.J.; Mentz, A.L.P.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da planta medicamento**. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NOGUEIRA, R.C.; CERQUEIRA, H.F.; SOARES, M.B.P. 2010. Patenting bioactive molecules from biodiversity: the Brazilian experience. **Expert Opinion Ther. Patents** 20(2): 1-13.

OKA, C. 1998. Herbário de plantas medicinais: estufa de mudas em Caucaia do Alto Cotia. São Paulo.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2006. Mental and Neurological Disorders 'Depression'.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS) / WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2007. Mental health: strengthening mental health promotion.

ORAV, A.; ARAK, E.; RAAL, A. 2006. Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European Countries. **Natural Product Research**, v. 20, N^o. 12, p 1082-1088.

OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. 2005. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur J. Pharmacol.** 507: 253-259.

PACIORNIK, E. F. 1989. Plantas medicinais do município de Curitiba, Paraná. Família Asteraceae Dumortier. 167 f. Curitiba. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

PALADINI, A.C., MARDER, M., VIOLA, H., WOLFMAN, C., WASOWSKI, C., MEDINA, J.H., 1999. Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds. **J. Pharm. Pharmacol.** 51 (5), 519–526.

PALUCHA, A., PILC, A., 2002. On the role of metabotropic glutamate receptors in the mechanisms of action of antidepressants. **Pol. J. Pharmacol.** 54, 581–586.

PANIZZA, S., 1997. Plantas que curam: cheiro de mato. 17 ed., São Paulo: **Ibrasa**. p 152-153.

PAPAKOSTAS, G.I. 2006. Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. **Eur Neuropsychopharmacol.** 16(6): 391-402.

PAPAKOSTAS, G.I. 2010. The efficacy, tolerability, and safety of contemporary antidepressants. **J Clin Psychiatry**; 71 Suppl. E1: e 03.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A.D.B.; Chorghade M. 2004. Ayurved and natural products drug discovery. **Curr Sci.** 86:789-99.

PEANA, A.T.; D'AQUILA, P.S.; CHESSA, M.L.; MORETTI, M.D.; SERRA, G.; PIPPIA, P. 2003. (-)-Linalool produces antinociception in two experimental models of pain. **Eur J. Pharmacol.** 406: 37-41.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. AND BRILEY, M. 1985. Validation of open-closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. of Neurosc. Methods**, 14: 149-167.

PELLOW, S.; FILE, S. 1986. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 24(30): 525-9.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. 1985. Validation of open closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, 14(3): 149-67.

PETIT-DEMOULIERE, B.; CHENU, F.; BOURIN, M. 2005. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. **Psychopharmacol.**, 177: 245-255.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. 2002. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**. V. 25, supl. 1, p. 45-61.

PIO CORREIA, M. 1974. Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. v. 5, Rio de Janeiro: **Ministério da Agricultura e Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Forestal**, p. 687.

PIRES, J.M.; MENDES, F.R.; NEGRI, G.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; CARLINI, E.A. 2009. Antinociceptive peripheral effect of *A. millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. **Phytother Res** 23(2):212-9.

PLOSS, O., PETEREIT, F., NAHRSTEDT, A., 2001. Procyanidins from the herb of *Hypericum perforatum*. **Pharmazie** 56, 509–511.

PORSOLT, R.D; BERTIN, A.; JALFRE, M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, London, 266:730-732.

PORSOLT, R.D. 1989. The silent epidemic: the search for treatment of age-related memory impairment. **Trends Pharmacol Sci**. Jan; 10(1):3-6. Review.

PORSOLT, R.D. 1990. Behavioural despair: present status and future perspectives. Antidepressants: thirty years on. **London: CNS** p. 85-94.

POTRICH, F. B.; ALLEMAND, A.; Da SILVA, L.M.; Dos SANTOS, A.C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MENDES, D.A.G.B.; ANDRE, E.; WERNER, M.F.de P.; MARQUES, M.C.A. 2010. Antiulcerogenic activity of hydralcoholic extract of *Achillea millefolium* L: Involvement of the antioxidant system. **J of Ethnopharmacol**. 130:85-92.

PROTAIS, P.; COSTENTIN, J., SCHWARTZ, J.C. 1976. Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a simple test for the study of dopamine receptors in Striatum. **Psychopharmacol**. 50, 1-6.

PRISTA, L.N.; ALVES, A. C. 1975. Técnica farmacêutica e farmácia galênica. 2. ed. v.1. Lisboa: **Fundação Calouste Gulbenkian**. p. 389-400.

RAHIMI, R.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. 2009. Efficacy and tolerability of *Hypericum perforatum* in major depressive disorder in comparison with selective serotonin reuptake inhibitors: A meta-analysis. **Progress in Neuro-Psychopharmacol. and Biolog. Psych.**, v. 33, Issue 1, p. 118-127.

RATES, S.M.K. 2001. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613.

RAUPP, I.M.; SERENIKI, A.; VIRTUOSO, S.; GHISLANDI, C.; CAVALCANTI e SILVA, E.L.; TREBIEN, H.A.; MIGUEL, O.G.; ANDREATINI, R. 2008. Anxiolytic-like effect of chronic treatment with *Erythrina velutina* extract in the elevated plus-maze test. **J. of Ethnopharmacol**. 118: 295-299.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB Journal**. 22, 659-661.

REDDY, D.S.; KULKARNI, S.K. 1996. Role of GABA-A and mitochondrial diazepam binding inhibitor receptors in the anti-stress activity of neurosteroids in mice. **Psychopharmacol.** (Berl). 128, 280-292.

REICHERT, C.L. 2011. Avaliação da aplicação de modelos comportamentais na busca de planta promissora para produção de novos produtos para ansiedade e depressão na indústria farmacêutica nacional. 136 f. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina.

REIS, M.S. dos. 1996. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. In: DI STASI, L.C. (organizador) **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, p. 198-214.

REIS, M.S. dos; MARIOT, A. 2002. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In: Simões. C.M.O. et al. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 4ª. Ed., **Ed Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC**, p. 42.

REIN, D., LOTITO, S., HOLT, R.R., KEEN, C.L., SCHMITZ, H.H., FRAGA, C.G., 2000. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. **J. Nutr.** 130 (8S Suppl.), 2109S–2114S.

REYES, M.; SARAIVIA, A. 1995. Contribución al estudio farmacológico de las hojas da *Daucus carota*, *A. graveolans* y *Achillea millefolium*, de uso popular em Guatemala como sedantes e hipnóticos. Guatemala, Departamento de Farmacologia Universidad de San Carlos.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACEDO, R.O.; BARBOSA-FILHO, J.M. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 12: 514-535.

RODRIGUES, E. 2005. A parceria Universidade-Empresa privada na produção de fitoterápicos no Brasil. **Revista Fármacos e Medicamentos**. São Paulo, n. 37, ano IV, p. 30-39.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. 1994. The elevated plus-maze: pharmacology, methodology and ethology. In: Cooper, S. J.; Hendrie, C. A. (Eds.), **Ethology and Psychopharmacol.** Eiley, Chichester, p. 99-44.

RODGERS, R.J.; JOHNSON, N.J. 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacol. Biochemic and Behav.** 52, 297-303.

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

SÀNCHEZ-MATEO, C.C.; BONKANKA, C.X.; PRADO, B.; RABANAL, R.M. 2007. Antidepressant activity of some *Hypericum reflexum* L. fil. extracts in the forced swimming test in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.112, p.115-121.

SANSANA, A.C.R.L. 1999. Estudos das ações do extrato bruto das folhas de *Achillea millefolium* L. (COMPOSTAS), sobre o trato gastrointestinal: investigação da possível ação antiulcerogênica em ratos. Curitiba. Monografia (Especialização em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. 2008. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evid Based Complement Alternat Med.**; 5:1-12.

SARRIS, J. 2007. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: A systematic review. **Phytother. Resear.**, vol. 21, p. 703-716.

SCHMIDT, M.V.; MÜLLER, M.B. 2006. Animal models of anxiety. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v.3, n.4.

SCHUSTER, B.G. 2001. A new integrated program for natural product development and the value of an ethnomedical approach. **J. Altern. Complement. Med.**, v.7 (Suppl. 1), p. S61 – S72.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. 2001. Rational Phytotherapy: A Physican's Guide to Herbal Medicine. **Springer**: Berlin; 294.

SENA, L.M.; BUENO, C.; POBBE, R.L.H.; ANDRADE, T.G.C.S.; ZANGROSSI, JR., H.; VIANA, M.B. 2003. The dorsal raphe nucleus exerts opposed control on generalized anxiety and panic-related defensive responses in rats. **Behav. Brain Res.** v.142, p.125-133.

SERTIE, J.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. 1990. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Med** 56(1):36-40.

SHERMAN, A.D.; SACQUITINE, J.L.; PETTY, F. 1982. Specificity of the learned helplessness model of depression. **Pharmacol Biochem Behav.** 16:449-454.

SI, X.T.; ZHANG, M.L.; SHI, Q.W.; KIYOTA, H. 2006. Chemical constituents of the plants in the genus *Achillea*. **Chem Biodivers** 3: 1163-1180.

SILVA, M.I.G.; GONDIM, A.P.S.; NUNES, I.F.S.; SOUZA, F.C.F. 2006. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev. Bras. Farmacogn** 16: 455-462.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSSMANN, G; MELLO, JCP, MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. 2001. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3ª. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: **Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC**.

SIMÕES, C.M.O. 2007. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre: **Ed. da UFRGS**.

SKALISZ, L.L.; BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. 2004. Effect of *Hypericum perforatum* on marble-burying by mice. **Phytother. Resear.**, 18, 399–402.

SOARES, A.K.A.; CARMO, G.C.; QUENTAL, D.P.; NASCIMENTO, D.F.; BEZERRA, F.A.F.; MORAES, M.O.; MORAES, M.E.A. 2006. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo *Mikania glomerata*, *Grindelia robusta*, *Copaifera officinalis*, *Myroxylon toluifera*, *Nasturtium officinale*, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Rev Bras Farmacogn** 16: 447-454.

SOUSA, F.C.F, MELO, C.T.V; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.M; GUTIERREZ, S.J.C; PEREIRA, B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M; VASCONCELOS, S.M.M; FONTELES, M.F.; VIANA, G.S.B. 2004. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacol Biochem Behav** 78: 27-33.

SOUSA, F.C.F; MONTEIRO, A.P; MELO, C.T.V.; OLIVEIRA, G.R.; VASCONCELOS, S.M.M; FONTELES, M.M.F; GUTIERREZ, S.J.C; BARBOSA-FILHO, J.M.; VIANA, G.S.B. 2005. Antianxiety effects of riparin I from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Phytother Res** 19: 1005-1008.

SOUSA, F.C.F; LEITE, C.P.; MELO, C.T.V; ARAÚJO, F.L.O; GUTIERREZ, S.J.C; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.F; VASCONCELOS, S.M.M; VIANA, G.S.B. 2007. Evaluation of effects of *N*-(2-hydroxybenzoyl) tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in anxiety models in mice. **Biol Pharm Bull** 30: 1212-1216.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; CITÓ, M.C.; FÉLIX, F.H.C.; VASCONCELOS, S.M.M.; FONTELES, M.M.F.; BARBOSA FILHO, J.S.; VIANA, G.S.B. 2008. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Braz. J. Pharmacogn.**, 18(4): 642-654.

SOUZA, T.M.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D.; RANGEL, V.L.B.I. 2005. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Braz. J. Pharmacogn.**, 15(1): 36-38, jan/mar.

SOUZA, T.M.; RANGEL, V.L.B.I.; PIETRO, R.C.R.; SANTOS, L.E.; MOREIRA, R.R.D. 2006. Phytochemical screening of *Achillea millefolium* harvested at Araraquara – SP. **Rev. Bras. Pl. Med**, Botucatu, v.8, n. esp., p. 151-154.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. 2010. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Braz. J. Pharmacogn.** 20(3): 435-440, Jun./Jul.

SOUBRIÉ, P.; KULKARNI, S.; SIMON, P.; BOISSIER, J.R. 1975. Effects of antianxiety drugs on the food intake in trained and untrained rats and mice. **Psychopharmacol.**, dec 31; 45(2):203-10.

SPRINGFIELD, E.P.; EAGLES, P.K.F.; SCOTT, G. 2005. Quality assessment of South African herbal medicines by means of HPLC fingerprinting. **J. Ethnopharmacol** 101: 75-83.

STANKEVICIUS, D.; RODRIGUES-COSTA, E.C.; CAMILO FLÓRIO, J.; PALERMONETO J. 2008. Neuroendocrine, behavioral and macrophage activity changes induced by picrotoxin effects in mice. **Neuropharmacol.** 54: 300-308.

STEENBERGEN, H.L., FARBOLLINI, F.; HEINSBROEK, R.P.W.; VAN DE POLL, N.E. 1991. Sexdependent effects of aversive stimulation on holeboard and elevated plus-maze behaviour. **Behav. Brain Res.**, 43: 159-165.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. 1985. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacol.** (Berl) 85, 367–370.

SWINYARD, E.A.; BROWN, W.C.; GOODMAN, L.S. 1952. Comparative assays of antiepileptic drugs in mice and rats. **J. Pharmacol, Exp. Ther.**, 106(3):319-30.

TAKZAREE, N.; MORTAZAVI, H.; SAFAIE, S.; HOSSEINI, S.J. 2008. Assessment the effect of *Achillea millefolium* L. extract on spermatogenesis and its reversibility. Abstracts / **Toxicology Letters** 180S: S32–S246.

TANTAQUIDGEON, G. 1974. Folk medicine of the delaware and related algonkian indians. Pennsylvania Hist and Mus Commission **Anth Papers**, v. 3, n. 74, p. 128.

TEIXEIRA, R.C.; ZANGROSSI, Jr. H.; GRAEFF, F.G. 2000. Behavioral effects of acute and chronic imipramine in the elevated T-maze model of anxiety. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, 65: 571-576.

TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. 2003. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L. in in vivo assays. **Genet Mol Biol** 26: 551-555.

TEIXEIRA-SILVA, F; QUEIROGA, M.N. G de; VARELA, R.W.B.; FECHINE, M.F. 2006. Métodos para avaliar drogas antidepressivas. In: ALMEIDA, R.N. (Org.). *Psicofarmacologia: fundamentos práticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 262-274.

TESKE, M. ; TRENTINI, A.M.M. 1997. **Compêndio de Fitoterapia**. Ed., Curitiba: Herbarium.

THORWALD, J. 1990. O segredo dos médicos antigos. São Paulo: **Melhoramentos**, 318 p.

TREIT, D.; PINEL, J.P.J. and FIBIGER, H.C. 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 15, no. 4, pp. 619–626.

TREIT, D., 1985. Animal models for the study of antianxiety agents: a review. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 9, 203–222.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C.1993. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. **Pharmacol., Biochem. and Behav.**, 44: 463-469.

TRIFUNOVIC, S.; VAJS, V.; JURANIC, Z.; ZIZAC, Z.; TESEVIC, V.; MACURA, S. 2006. Cytotoxic constituents of *Achillea clavennae* from Montenegro. **Phytochem.**,67(9):887-93.

TRUMBECKAITE, S.; BENETIS, R.; BUMBLAUSKIENE, L.; BURDULIS, D.; JANULIS, V.; TOLEIKIS, A.; VISKELIS, P.; JAKSTAS, V. 2011. *Achillea millefolium* L. s.l. herb extract: Antioxidant activity and effect on the rat heart mitochondrial functions. **Food Chemistry** 127:1540–1548.

TUBEROSO, C.I.; MONTORO, P.; PIACENTE, S. CORONA, G.; DEIANA, M.; DESSI, MA.A.; PIZZA, C.; CABRAS, P. 2009. Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. **J of Pharmacol and Biomed. Analys.** 50. 440-448.

VAFAEI, A.A.; ZAHEDI-KHORASANI, M.; TAHERIAN, A.A.; RAJABI, M.R. 2006. Evaluation of the effect of hydroalcoholic extract of *A. millefolium* on anxiety reaction in mice: probably interaction with opioidergic neurons. **FENS Abstr** 3: A164.22.

VAN-DER STAAY, F.J. 2006. Animal models of behavioral dysfunctions: Basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. **Brain Reseac Reviews** 52, 131-159.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. 2008. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18:464-471.

VICENTINI, V.E.P.; CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O. and MANTOVANI, M.S. 2001. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scient.**, vol. 23, no. 2, pp. 593–598.

VIOLA, H.; WASOWSKI, C.; LEVI, M.; WOLFMAN, C.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; MEDINA, J.H.; PALADINI, A.C. 1995. Apigenin a component of *Matricaria recutita* flowers is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. **Plant Med.** 61:213-216.

VOGEL, H.G. 2008. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays. 3rd Edition. Berlin: Springer-Verlag, 2071 p.

WAGNER, H., 1993. Leading structures of plant origin for drug development. **J Ethnopharmacol** 38(2-3):105-112.

WAGNER, H. 1996. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, 2nd edn **Springer-Verlag: Berlin**; 350.

WANG, L.E.; BAI, Y.J.; SHI, X.R.; CUI, X.Y.; ZHANG, F.; ZHANG, Q.Y.; ZHAO, Y.Y.; ZHANG, Y.H. 2008, Spinosin, a C-glycoside flavonoid from semen Zizhiphi spinosae, potentiated pentobarbital-induced sleep via the serotonergic system. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.90, n.3, p.399-403.

WICHTL, M. 2004. Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A Handbook for Practice on a Scientific Basic. 3a. ed.

WILLUHN, G. 2002. Millefolii herba. In *Teedrogen und Phytopharmaka*, (4th edn.), Wichtl M (ed.). **Wiss. Verlagsgesellschaft: Stuttgart**; 399-403.

WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEOUS, S.; MUSCAT, R. 1987. Reduction of sucrose preference by chronic mild unpredictable stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. **Psychopharmacol.** 93: 358-364.

WILLNER, P. 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacol.** 134, 319–329.

WONNEMANN, M., SINGER, A., SIEBERT, B., MULLER, W.E., 2001. Evaluation of synaptosomal uptake inhibition of most relevant constituents of St. John's wort. **Pharmacopsychiatry** 34 (Suppl. 1), S148–S151.

XU, Y.; KU, B-S.; YAO, H-Y.; LIN., Y-H.; XING, M.A.; ZHANG, Y-H.; LI, X-J. 2005. The effects of curcumin on depressive like behaviors in mice. **Eur J Pharmacol.** 518:40-46.

YAEESH, S.; JAMAL, Q.; KHAN, A.U.; GILANI, A.H. 2006. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. **Phytother Res** 20(7): 546-51.

YU, H.S.; LEE, S.Y.; JANG, C.G. 2007. Involvement of 5-HT_{1A} and GABA_A receptors in the anxiolytic-like effects of *Cinnamomum cassia* in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.87, n.1, p.164-170.

ZANOLI, P.; AVALLONE, R.; BARALDI, M. 2000. Behavior characterization of the flavonoids apigenin and chrysin. **Fitoterapia** 71, S117-S123.

ZANOVELI, J.M.; NOGUEIRA, R.L.; ZANGROSSI, H. Jr. 2003. Serotonin in the dorsal periaqueductal gray modulates inhibitory avoidance and one-way escape behaviors in the elevated T-maze. **Eur. J. Pharmacol.**, 473 (2-3): 153-161.

ZHANG, Z. 2004. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sciences**, v. 75, p. 1659-1699.

ZHANG, Z. Q.; YUAN, L.; YANG, M.; LUO, Z.P.; ZHAO, Y.M. 2002. The effect of *Morinda officinalis* How, a Chinese traditional medicinal plant, on the DRL 72-s schedule in rats and the forced swimming test in mice. **Pharmacol Biochem Behav.** 72(1-2): 39-43.

ZITTERL-EGLESEER, K.; JURENITSCH, J.; KORHAMMER, S.; HASLINGER, E.; SOSA, S.; DELLA LOGGIA, R.; KUBELKA, W.; FRANZ, C. 1991. Sesquiterpenelactones of *Achillea setacea* with antiphlogistic activity. **Plant Med** 57, 444–446.

ANEXO – 1

Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo experimentação animal da UNIPAR

UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR
Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93
Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC
DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO
COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da possível atividade central do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L. em camundongos.", protocolo 13911/2008, sob a responsabilidade de IRINEIA PAULINA BARETTA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, segundo o disposto na Lei nº 11.794/2008, tendo sido aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 17/04/2008.

We certify that the project "Avaliação da possível atividade central do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L. em camundongos.", protocol 13911/2008, in the responsibility of IRINEIA PAULINA BARETTA, is in agreement with the Ethical Principles of Animal Experimentation, according to law 11.794/2008, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 04/17/2008.

UMUARAMA - PR, 06/02/2012.


Prof. Msc. Juliana Silveira Do Valle
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº: 13911


Dayane Aparecida Fagundes Paschoal da Silva
Secretária CEPEEA/UNIPAR

**UNIVERSIDADE PARANAENSE - UNIPAR**

Reconhecida pela Portaria - MEC Nº 1580, DE 09/11/93 - D.O.U. 10/11/93

Mantenedora: Associação Paranaense de Ensino e Cultura - APEC

DIRETORIA EXECUTIVA DE GESTÃO DA PESQUISA E DA PÓS GRADUAÇÃO

COORDENADORIA DE PESQUISA E INICIAÇÃO CIENTÍFICA - COPIC



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEPEEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CENTRAL DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOOLICO E DAS FRAÇÕES ETANOLICA (FET), DICLOROMETANO (FDM) E ACETATO DE ETILA (FAE) DA *ACHILLEA MILEFOLIUM* L. EM CAMUNDONGOS SUIÇOS.", protocolo 20414/2011, sob a responsabilidade de IRINEIA PAULINA BARETTA, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, segundo o disposto na Lei nº 71.794 de 2008, tendo sido aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) em reunião realizada em 28/09/2010.

We certify that the project "AVALIAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO CENTRAL DO EXTRATO BRUTO HIDROALCOOLICO E DAS FRAÇÕES ETANOLICA (FET), DICLOROMETANO (FDM) E ACETATO DE ETILA (FAE) DA *ACHILLEA MILEFOLIUM* L. EM CAMUNDONGOS SUIÇOS.", protocol 20414/2011, in the responsibility of IRINEIA PAULINA BARETTA, is in agreement with the Ethical Principles of Animal Experimentation, according to law 11.794/2008, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH OF UNIPAR (CEPEEA/UNIPAR) in 09/28/2010.

UMUARAMA - PR, 07/02/2012.



Prof.ª Msc. Juliana Silveira Do Valle
Presidente CEPEEA/UNIPAR

Registro Nº: 20414



Dayane Aparecida Fagolo Paschoal da Silva
Secretária CEPEEA/UNIPAR

ANEXO – 2

Artigo Publicado

Journal of Ethnopharmacology 140 (2012) 46–54



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharmAnxiolytic-like effects of acute and chronic treatment with *Achillea millefolium* L. extract

Irinéia Paulina Baretta^{a,b,*}, Regiane Américo Felizardo^a, Vanessa Fávero Bimbato^a,
Maísa Gonçalves Jorge dos Santos^a, Candida Aparecida Leite Kassuya^{b,c},
Arquimedes Gasparotto Junior^{a,b}, Cássia Regina da Silva^d, Sara Marchesan de Oliveira^d,
Juliano Ferreira^d, Roberto Andreatini^b

^a Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – Farmacologia, Universidade Paranaense, Umuarama 87502-210, PR, Brazil^b Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 82015-690, PR, Brazil^c Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados 79825-070, MS, Brazil^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 97105-900, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2011

Received in revised form

11 November 2011

Accepted 27 November 2011

Available online 6 December 2011

Keywords:

Achillea millefolium

Anti-anxiety agents

Anxiety

Apigenin

GABA antagonist

Flumazenil

Picrotoxin

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), known as yarrow ("mil folhas"), has been used as folk medicine for gastrointestinal disorders, inflammation, anxiety, and insomnia.

Aim: To evaluate the potential anxiolytic-like effect of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L. in animal models.

Methods: The present study evaluated the effects of the hydroalcoholic extract from the aerial parts of *Achillea millefolium* L. in mice subjected to the elevated plus-maze, marble-burying, and open-field tests. Additionally, the GABA_A/benzodiazepine (BDZ) mediation of the effects of *Achillea millefolium* was evaluated by pretreatment with the noncompetitive GABA_A receptor antagonist picrotoxin and the BDZ antagonist flumazenil and by [³H]-flunitrazepam binding to the BDZ site on the GABA_A receptor.

Results: *Achillea millefolium* exerted anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze and marble-burying test after acute and chronic (25 days) administration at doses that did not alter locomotor activity. This behavioral profile was similar to diazepam. The effects of *Achillea millefolium* in the elevated plus-maze were not altered by picrotoxin pretreatment but were partially blocked by flumazenil. Furthermore, *Achillea millefolium* did not induce any changes in [³H]-flunitrazepam binding.

Conclusion: The results indicate that the orally administered hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L. exerted anxiolytic-like effects that likely were not mediated by GABA_A/BDZ neurotransmission and did not present tolerance after short-term, repeated administration.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Numerous traditionally used plants exhibit pharmacological properties with great potential for therapeutic applications in the treatment of central nervous system disorders, such as anxiety disorders (Carlini, 2003; Faustino et al., 2010). *Achillea millefolium* L. (Asteraceae), known as yarrow ("mil folhas"), is a perennial herb that has been used for hundreds of years in folk medicine in several countries (Chandler et al., 1982; Wichtl and Bisset, 1989). In Germany and Italy, it is used for the treatment of gastrointestinal

disturbances. In Britain and North America, it is used to treat bleeding (Bruneton, 1999; Willuhn, 2002; Applequist and Moerman, 2011). In Brazil, its main indication is for the treatment of pain, wounds, inflammation, and gastrointestinal complaints (Dalsenter et al., 2004; Cavalcanti et al., 2006; Pires et al., 2009), although plant infusion or the decoction of the aerial parts of the plant is indicated for "calmness" (Manfrini et al., 2009). This latter indication is also seen in Mexico (Molina-Hernandez et al., 2004).

Previous preclinical studies have corroborated its safety and antinociceptive and antiulcer effects (Dalsenter et al., 2004; Cavalcanti et al., 2006; Pires et al., 2009). Although *Achillea millefolium* L. has been proposed as a folk remedy in the treatment of central nervous system disorders, very few data have been published supporting this claimed ethnomedical action. Molina-Hernandez et al. (2004) used a conflict operant procedure and showed that the anticonflict-like actions of an aqueous extract of

* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biológicas, Médicas e da Saúde – Farmacologia, Universidade Paranaense, Umuarama 87502-210, PR, Brazil.
Tel.: +55 44 3621 2822x1403; fax: +55 44 3621 2822x1403.
E-mail addresses: irineiapaulina@hotmail.com, neia@unipar.br (I.P. Baretta).