



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**TOXICIDADE AGUDA, NEUROTOXICIDADE, TOXICIDADE REPRODUTIVA E
EMBRIOTOXICIDADE DO CHÁ AYAHUASCA (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria
viridis*) EM RATAS Wistar.**

LUCIANA SOARES GUEIROS DA MOTTA

Brasília-DF

2013

LUCIANA SOARES GUEIROS DA MOTTA

**TOXICIDADE AGUDA, NEUROTOXICIDADE, TOXICIDADE REPRODUTIVA E
EMBRIOTOXICIDADE DO CHÁ AYAHUASCA (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria
viridis*) EM RATAS WISTAR.**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde, da
Universidade de Brasília.**

Orientadora: Prof^a Dr^a Eloisa Dutra Caldas

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Aline Pic-Taylor

Brasília-DF

2013

LUCIANA SOARES GUEIROS DA MOTTA

**TOXICIDADE AGUDA, NEUROTOXICIDADE, TOXICIDADE REPRODUTIVA E
EMBRIOTOXICIDADE DO CHÁ AYAHUASCA (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria
viridis*) EM RATAS WISTAR.**

**Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências de Saúde da
Universidade de Brasília.**

BANCA EXAMINADORA

Presidente: Prof^ª Dr^ª Eloisa Dutra Caldas

Membros: Prof^ª Dr^ª Vania Maria Moraes Ferreira

Prof^ª Dr César Koppe Grisolia

Prof^ª Dr Maurício Homem de Mello (suplente)

Brasília

2013

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por todas as coisas boas que vivi e aprendi nesse trabalho.

Obrigada a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento profissional. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

Obrigada professora Eloisa Caldas pela confiança que me foi dada para realização desse projeto, assim como a grande aprendizagem que a senhora, mesmo sem sentir, transmite a todos seus alunos.

Obrigada à companheira de trabalho e agora grande amiga Juliana Alves. Trabalhamos muito, porém sempre com muita parceria, competência, responsabilidade e acima de tudo amizade. As infinitas horas de trabalho foram sempre muito agradáveis ao seu lado.

Obrigada às alunas de iniciação científica Ana Mundim e Alana Santos pelo excelente trabalho e dedicação.

Obrigada à Professora Aline Pic-Taylor, por sempre me acolher e tentar solucionar meus problemas, além de desenvolver minha capacidade científica.

Ao Professor Osmino Junior, por ter auxiliado na liofilização do nosso material de estudo.

A Professora Vânia Ferreira, pelos ensinamentos iniciais e grande parceria.

Ao Emiraldo, cuidador de nossos animais, meus sinceros agradecimentos.

Ao Dr. Francisco Paumgarten agradeço mais uma vez por confiar em meu trabalho e por transmitir tanto conhecimento, além de ceder espaço físico para realização de minhas análises.

À Rosângela Carvalho que nos contagia pelo amor ao trabalho, meu muito obrigada. Aprendi com você a paciência que um bom estudo exige.

À minha mãe que nunca mediu esforços para me oferecer uma boa educação e que sempre me apoiou, dando força e coragem nos momentos difíceis.

Agradeço com ênfase meu marido, que me ajudou em todos os momentos difíceis desta caminhada, sempre me dando o apoio e força necessária para que meu crescimento profissional fosse concluído. Muito obrigada pelo incentivo, pela compreensão em minhas ausências e pelo seu amor.

O agradecimento mais sincero a minha filha, que acompanhou grande parte deste meu esforço durante seu desenvolvimento e, mesmo sem falar, me concede uma força inexplicável. Isabela, você é a nossa razão de viver, tradução mais simples e sólida do nosso amor.

À União do Vegetal pelo material de estudo, sem este esse, o trabalho não teria sentido.

À UnB pela oportunidade acadêmica.

À todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho direta ou indiretamente, meus sinceros agradecimentos.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita."

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Origem e uso do chá de ayahuasca no contexto religioso	1
1.2 Caracterização química e mecanismos de ação das substâncias presentes no chá de ayahuasca	5
1.3 Efeitos biológicos do chá de ayahuasca	7
1.4 Potencial terapêutico	9
1.5 Potencial toxicológico	11
1.5.1 Estudos de neurotoxicidade e testes de comportamento	14
1.5.2 Toxicologia reprodutiva	18
2- OBJETIVOS	22
3- MATERIAS E MÉTODOS	23
3.1. Chá de ayahuasca	23
3.1.1 Caracterização química	23
3.2 Animais	24
4- RESULTADOS	25
CAPÍTULO I	26
CAPÍTULO I	50
5- CONCLUSÕES FINAIS	73
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

CAPÍTULO I - Acute oral toxicity and neurotoxic potential of the ayahuasca infusion (<i>Banisteriopsis caapi</i> and <i>Psychotria viridis</i>) in female wistar rats	26
Abstract	26
1. Introduction	27
2. Material and methods	29
2.1. Animals	29
2.2. Ayahuasca infusion	29
2.3. Chemical characterization of the ayahuasca infusion	29
2.4. Acute oral toxicity	30
2.5. Behaviour tests	31
2.6. Neurotoxicity assays	31
2.7. Statistical analysis	33
3. Results	33
3.1. Acute toxicity	33
3.2. Behaviour tests	34
3.3 Neurotoxicity	37
4. Discussion	39
5. Conclusion	44
Aknowlegment	44
References	45
CAPÍTULO II - Toxicidade reprodutiva do chá de ayahuasca em ratas wistar	50
1. Introdução	50
2. Protocolo experimental	50
3. Resultados	53
4. Discussão	71

LISTA DE ABREVIATURAS

CONAD	Conselho Nacional Anti - Drogas
CONFEN	Conselho Federal de Entorpecentes
Cmx	Concentrações Plasmáticas Máximas
DIMED	Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos
DMT	N, N-dimetiltriptamina
ECC	<i>European Economic Community</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HRS	<i>Hallucinogen Rating Scale</i>
HRL	Harmina
HRM	Harmalina
IAA	Alcalóides Indólicos Aminas
LCE	Labirinto em Cruz Elevado
MAO	Monoamina Oxidase
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
SSRI	Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
SNC	Sistema Nervoso Central
TGI	Trato Gastrointestinal
THH	Tetrahydroharmalina
UDV	União do Vegetal
5-HT	Serotonina
5-Meo-DMT	5-Metoxi-N,N-dimetiltriptamina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Folhas, chacrona - <i>Psychotria viridis</i> e o cipó, mariri - <i>Banisteriopsis caapi</i>	2
Figura 2: Preparo do chá de ayahuasca pela União do Vegetal.....	2
Figura 3: Estruturas químicas: harmina, harmalina, tetrahydroharmalina, N,N-dimetiltriptamina e serotonina.....	6
Figura 4: Manifestações clínicas da síndrome serotoninérgica.....	8
Figura 5: Protocolo de “Toxicologia Aguda de Classe”, Guia da OECD 423/2001.....	13
Figura 6: Aparelho utilizado para teste de campo aberto.....	15
Figura 7: Aparelho utilizado para teste de labirinto em cruz elevada.....	16
Figura 8: Aparelho utilizado para teste de natação forçada.....	17
Figura 9: Esquema geral dos estudos de toxicologia reprodutiva.....	21
Figura 10: Cromatograma e espectro de massa do padrão sintetizado de DMT.....	24

CAPÍTULO I - Acute oral toxicity and neurotoxic potential of the ayahuasca infusion (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) in female Wistar rats

Figure 1: Chemical structures of the main components of ayahuasca infusion.....	28
Figure 2: Results of the open field test.....	35
Figure 3: Results of the elevated plus-maze test.....	36
Figure 4: Results of the forced swimming test.....	37
Figure 5: <i>C-fos</i> reactive neurons from dorsal raphe nuclei.....	38
Figure 6: Number of <i>c-fos</i> reactive neurons from basolateral posterior amygdaloid nucleus.....	39
Table 1: Food consumption and organ weight (g) of the control group and ayahuasca treated groups during (single dose).....	34

CAPÍTULO II - Toxicidade reprodutiva do chá de ayahuasca em ratas *Wistar*

Figura 1: Resultados das alterações de peso relativo dos órgãos fígado, rins, baço e cérebro de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses de tratamento.....	56
Figura 2: Resultados das alterações de peso relativo do estômago de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses de tratamento.....	56
Figura 3: Resultados das alterações de peso relativo do coração de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses de tratamento.....	57
Figura 4: Resultados das alterações de peso relativo dos rins e timo dos fetos expostos <i>in utero</i> ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6° ao 20° dia gestacional.....	59
Figura 5: Resultados das alterações de peso relativo do baço dos fetos expostos <i>in utero</i> ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6° ao 20° dia gestacional.....	60
Figura 6: Resultados das alterações de peso relativo do fígado dos fetos expostos <i>in utero</i> ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6° ao 20° dia gestacional.....	61
Figura 7: Resultados das alterações de peso relativo do coração dos fetos expostos <i>in utero</i> ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6° ao 20° dia gestacional.....	61
Figura 8: Resultados das alterações de peso relativo do pulmão dos fetos expostos <i>in utero</i> ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6° ao 20° dia gestacional.....	62
Figura 9: Lóbulos com fissuras de fígados de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	65
Figura 10: Lóbulos do fígado controle e tratados. Forma irregular de lóbulos de fígados de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in útero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	66
Figura 11: Lóbulo extra de fígados de fetos expostos a chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	67
Figura 12: Testículo em posição irregular de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	67
Figura 13: Ovário em posição irregular de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	68
Figura 14: Útero em forma irregular de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	68
Figura 15: Rim em posição irregular de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	69

Figura 16: Ureter em forma irregular de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	69
Figura 17: Terceiro corte cerebral de fetos expostos ao chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	70
Figura 18: Anofalmia em feto exposto a 1X de chá de ayahuasca <i>in utero</i> do 6° ao 20° dia de gestação.....	70
Tabela 1: Sinais clínicos de toxicidade e alteração macroscópica de órgãos de ratas <i>Wistar</i> controle e tratadas com ayahuasca.....	54
Tabela 2: Resultados das alterações de peso corporal, peso do útero e consumo de ração de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses.....	55
Tabela 3: Resultados dos parâmetros maternos avaliados por ocasião da cesárea, realizada no 21° dia gestacional, de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses.....	58
Tabela 4: Parâmetros fetais avaliados por ocasião da cesárea de ratas <i>Wistar</i> controles e tratadas com ayahuasca.....	59
Tabela 5: Ocorrência de anomalias viscerais em fetos expostos <i>in utero</i> ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6° ao 20° dia gestacional.....	63

RESUMO

A ayahuasca é uma infusão vegetal psicoativa da Amazônia preparada a partir do cipó de *Banisteriopsis caapi*, que contém alcalóides β -carbolinas inibidores de monoamina oxidase, enzima que degrada o neurotransmissor serotonina. Além disso, essa infusão contém folhas de *Psychotria viridis*, constituída por N, N-dimetiltriptamina (DMT), agonista de receptores de serotonina. No Brasil, o chá é utilizado em contexto ritualístico principalmente pelas religiões União do Vegetal, Barquinha e Santo Daime. No presente estudo, ratas *Wistar* foram expostas via gavagem a doses relacionadas com a dose usual ingerida no ritual da UDV, 150 mL para uma pessoa de 70 kg (1X). O estudo de toxicidade aguda seguiu o protocolo OECD 423/2001, indicou uma DL_{50} maior que 50X. Uma hora após a administração única das doses 30X e 50X, os animais foram avaliados quanto à função comportamental nos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e natação forçada, indicando diminuição da locomoção e potencial efeito antidepressivo. Animais tratados com 30X mostraram alta atividade neural, indicada pela marcação de *c-fos*, nas regiões do núcleo da rafe, núcleo amigdalóide e formação hipocampal. A toxicidade reprodutiva do chá de ayahuasca foi avaliada de acordo com o protocolo OECD 414/2001. Ratas prenhes receberam o chá diariamente do 6° ao 20° dia gestacional nas doses 1, 2, 4 e 8X e a cesária foi realizada no 21° dia. Pelo menos um animal tratado, em todas as doses, apresentou piloereção, tremores e letargia. Onze animais no grupo 4X e 13 animais no grupo 8X foram a óbito durante o experimento. O peso do útero gravídico de ratas do grupo 8X foi significativamente menor que o controle. Ratas tratadas tiveram um maior número de reabsorções totais e precoce e menor número de fetos que ratas controle. Foram observadas alterações no fígado, posicionamento de testículo e ovários, forma irregular do ureter, ventrículos laterais cerebrais dilatados e 3° ventrículo cerebral dilatado nos fetos de animais tratados.

Palavras-Chaves: Ayahuasca, DL_{50} , neurotoxicidade, toxicidade materna, embriofetotoxicidade.

ABSTRACT

Ayahuasca is a psychoactive beverage prepared with the vine of *Banisteriopsis caapi*, which contains β -carbolines, an inhibitor of monoamine oxidase, enzyme that degrades the neurotransmitter serotonin, and the leaves of *Psychotria viridis*, which contains N,N-dimethyltryptamine (DMT), an agonist of serotonin receptors. The beverage is used in Brazil in the religious rituals of União do Vegetal (UDV) other religious groups. In the present study, wistar female rats were orally exposed to doses related to the usual dose taken during the UDV ritual, 150 mL by a 70 kg person (1X). The acute toxicity study, conducted according to the OECD 423/2001 protocol, showed a LD₅₀ higher than 50X. Behavioural functions were investigated one hour after dosing once at 30 and 50X using the open field, elevated plus maze and forced swimming tests. Treated animals showed a significant decrease in locomotion in the open field and elevated plus maze and increase mobility in the forced swimming test which suggested that ayahuasca has an antidepressant effect. Treated animals at 30X showed higher neuronal activity, indicated by *c-fos* marked neurons, in dorsal raphe nuclei, amygdaloid nucleus and hippocampal formation brain regions. Fluoro-Jade B neuron staining indicated brain injury in the treated animals. Reproductive toxicity was evaluated according to the OECD 414/2001 protocol. Pregnant rats were exposed daily from the 6th to the 20th gestational day at the doses of 1, 2, 4 and 8X, and the cesarean performed at the 21st day. At least one animal from each treated group showed piloerection, tremor and lethargy. Eleven animals from the 4X and 13 animals from the 8X group died during the study. Rats from the 8X group had lower uterus weight than controls, and treated rats had a higher number of total and early absorptions and lower number of fetus than controls. Morphological alterations observed in fetus from treated groups were found in liver, ureter and brain, in addition to wrong positioning of testis and ovaries.

Key-words: Ayahuasca, LD₅₀, neurotoxicity, maternal toxicity, embriofetotoxicity.

1- INTRODUÇÃO

1.1 Origem e uso do chá de ayahuasca no contexto religioso

A palavra ayahuasca é originária da língua quéchua cuja etimologia é: “*Aya*”: “pessoa morta, espírito” e “*Waska*”: “corda, liana, cipó”. Numa tradução literal, a palavra significa “corda dos mortos” ou “trepadeira das almas” uma referência ao cipó utilizado na preparação da bebida (Luna, 1986; Tupper, 2002).

A ayahuasca é uma infusão vegetal psicoativa da Amazônia que, desde tempos imemoráveis, é preparado e tomado pelos índios como instrumento espiritual e ritual, com extrema religiosidade. A origem do seu uso não é bem conhecida, mas segundo Naranjo (1986), descobertas arqueológicas indicam que o uso da bebida data da pré-história.

O chá de ayahuasca é utilizado por cerca de 70 tribos distintas da Amazônia, incluindo os Kaxinawá, Yaminawa, Sharanawa, Ashaninka, Airo-pai e Baranara (Costa, *et al.*, 2005).

As práticas específicas dos ayahuasqueiros indígenas amazônicos variam de acordo com os grupos culturais, e a grande maioria utiliza a bebida em um contexto cerimonial onde o experiente curador promove a conexão com espíritos. A ayahuasca para os indígenas é considerada uma planta mestre, uma ferramenta de diagnóstico e cura (Tupper, 2008). No contexto religioso, os usuários procuram atingir um estado ampliado de consciência, onde alegam ser possível uma comunhão e integração intensa com o Cosmos, com a Natureza e com o Criador.

Na década de 1930, apareceram no Brasil às religiões cristãs que introduziram a ayahuasca como pilar ritualístico: o Santo Daime, a Barquinha e a União do Vegetal (UDV). No contexto internacional, o uso do chá de ayahuasca é difundido em vários países da América do Sul e, nos últimos anos, existem adeptos nos Estados Unidos e em países europeus como Alemanha, Espanha, França e Inglaterra (Tupper, 2008). O chá tem denominações diferentes no Brasil: ayahuasca, quando preparado pelos índios na floresta, Santo Daime, quando preparado na igreja do mesmo nome e oaska ou vegetal quando preparado pela União do Vegetal. Segundo Pipkin *et al.*, (2009), essas religiões já chegam a 10 mil membros.

Ayahuasca é formada pela mistura de dois ingredientes principais: o cipó mariri, *Banisteriopsis caapi*, e a folha do arbusto chacrona, *Psychotria viridis* (Figura 1), que são fervidos em água. O preparo do chá varia entre os grupos religiosos, principalmente com relação ao tempo de cozimento e quantidade de mariri e chacrona utilizado (Figura 2).



Figura 1: Folhas, chacrona - *Psychotria viridis* e o cipó, mariri - *Banisteriopsis caapi*.



Figura 2. Preparo do chá de ayahuasca pela União do Vegetal.

O Santo Daime foi à primeira religião fundada no Brasil em Rio Branco – Acre, no ano de 1930, pelo maranhense e ex-seringueiro Raimundo Irineu Serra conhecido como *curador*. A palavra Daime vem do verbo “dar” mais o pronome “me”, como um pedido: – “Dai-me força, dai-me luz” (Labete & Araújo, 2002). No daimismo, existem várias técnicas como a “do nascimento e da obstetrícia” em que o chá é utilizado por grávidas como protetor e facilitador do parto. As mulheres desta religião ayahuasqueira, em geral, dão uma gota de Daime aos recém-nascidos que podem ou não continuar bebendo o chá ao longo da vida (Labete & Araújo, 2002). Vale destacar o reconhecimento pelos usuários da ação terapêutica da substância (Pires *et al.*, 2010).

A Barquinha foi fundada também em Rio Branco - Acre - em 1940 por Daniel Pereira de Mattos um ex-escravo. Essa religião ayahuasqueira também é formada por

elementos do catolicismo popular, xamanismo indígena, cristãos, afro-brasileiros e com grande influência da umbanda (Pires *et al.*, 2010) e, por isso, é considerada por alguns autores como a mais eclética e mais rica em termos de imagens e ritual das três religiões (Labete, 2004). O principal elemento é o Daime onde os praticantes da religião adquirem uma percepção diferenciada da realidade entrando em estado alterado de consciência (Labete & Araújo, 2002). É fiel as origens xamânicas e muitas das atividades estão dirigidas a cura de doenças físicas e psicossociais como o alcoolismo e o desemprego (MacRae, 2004). Há forte ênfase na remoção de espíritos malignos e combate a feitiçaria.

A peia é entendida como a "surra" aplicada pelo próprio Daime e durante o ritual se expressa por vômitos, diarreias, tonturas e outros sintomas. É considerada benéfica, pois, qualquer sofrimento vivenciado é limpo, como uma purificação física, moral e espiritual (Silva, 2004).

A União do Vegetal (UDV) é a mais nova das religiões ayahuasqueiras, com o maior número de associados e a mais institucionalmente organizada (MacRae, 2004). Seu fundador foi o baiano José Gabriel da Costa, em Porto Velho – Rondônia, em 1961. Com sede em Planaltina (Goiás) seus ensinamentos são baseados em uma doutrina cristã-reencarnacionista, permeada por elementos do espiritismo kardecista e de outras manifestações religiosas urbanas. Além disso, possui um caráter mais sóbrio e menos festivo (Pires *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2005).

Os rituais são dirigidos pelo *Mestre Geral* que é o representante homem do núcleo, não existindo mulheres nesta função. A UDV é uma organização composta por vários núcleos, cada um com uma organização altamente hierárquica de mestres, conselheiros, corpo instrutivo e outros. Os sócios têm compromissos sociais com a organização, não sendo permitido o uso de bebidas alcoólicas, tabaco, drogas ilícitas, delitos, bem como dançar ou assistir as cerimônias de outras religiões ayahuasqueiras. Existe uma rígida política de seleção dos autorizados a participar das cerimônias e os membros associados devem contribuir monetariamente, o que torna a organização próspera, com uma preocupação em tornar o uso do chá socialmente aceitável e rejeitar as atividades de curas (MacRae, 2004). Os núcleos contam com um departamento médico, composto por psiquiatras e outros profissionais que avaliam os sócios e os possíveis sócios da religião.

As cerimônias seguem um padrão, existe uma mesa central com os membros do alto escalão e os outros membros ficam sentados ao redor independentemente do sexo ou posto. Os frequentadores da UDV ingerem o chá em sessões quinzenais regulares que duram

aproximadamente quatro horas, em datas comemorativas e nos fins de semana de preparo do chá. O culto é iniciado com consumo do chá pelos membros que é visto como uma forma de atingir um estado de lucidez espiritual. Durante as horas seguintes ocorrem vários períodos de silêncio, interrompidos por chamadas ou canções que evocariam os espíritos protetores e questões são levantadas aos mestres. Esta doutrina mostra-se extremamente cuidadosa, organizada e fundamentada em seus conceitos e valores morais e religiosos.

O nome dado ao efeito psicoativo do chá pelos membros da religião é *burracheira* e significa “força estranha” ou “presença de força e luz”. Para os frequentadores a *burracheira* nem sempre é uma experiência fácil, embora sempre benéfica, purificadora e esclarecedora.

Com a globalização do chá de ayahuasca existiram pressões da sociedade a cerca da legalização do consumo desta substância, isso porque, as religiões ayahuasqueiras não se enquadram no padrão tradicional de culto espiritual, principalmente por conter um alucinógeno. O N, N-dimetiltriptamina (DMT), componente da ayahuasca, é uma substância controlada no Brasil (Portaria 1998) e internacionalmente sob a Convenção das Nações Unidas sobre Substâncias Psicotrópicas (*Convention on Psychotropic Substance*, 1971).

O processo de legalização da ayahuasca iniciou-se em 1986 pelo Conselho Federal de Entorpecentes (CONFEN), que retirou a bebida da lista de substâncias proscritas da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos (DIMED), o que viabilizou seu uso ritualístico. O processo de legalização teve continuidade com a Resolução Nº 4 do Conselho Nacional Anti-Drogas (CONAD), de 4 de novembro de 2004, que reconheceu o direito ao uso do chá em contextos religiosos, inclusive por menores de idade e grávidas, decisão essa que foi reiterada pela Resolução nº 1/2010. Segundo a resolução, o uso da ayahuasca por menores de 18 (dezoito) anos deve permanecer como objeto de deliberação dos pais ou responsáveis, e cabem as grávidas a responsabilidade do uso, atendendo, permanentemente, a preservação do desenvolvimento e da estruturação da personalidade do menor e do nascituro.

Atualmente, a expansão do uso da ayahuasca extrapola os limites de seu uso com fins religiosos ocorrendo mais significativamente na Europa e Américas (Callaway & Grob, 1998). Tal fato parece estar relacionado, ao menos em parte, com a facilidade de aquisição de pacotes turísticos por clientela que, ávida por experiências novas, se aventuram em expedições nas florestas, onde são convidados a experimentar a bebida em rituais (McKenna, 2004). O uso do chá também cresce em situações não-ritualísticas, como por exemplo, a título de experiências terapêuticas e o uso ilícito, onde se encontra um comércio

intenso e lucrativo com ofertas na internet e jornais. Uma busca na *internet* com o termo "vendo chá ayahuasca" no buscador *Google* realizada em 16 de janeiro de 2013 retornou 105.000 resultados, incluindo uma oferta do chá por 80 reais (<http://comida-alimentos-vinho.vivastreet.com.br/banquete-comida+barretos/vendo-cha--ayahuasca/53030016>).

Segundo Costa *et al.* (2005), a liberação da ayahuasca para uso em rituais religiosos no Brasil representou liberdade de culto e um aumento significativo do número de adeptos do chá. No entanto, o seu uso ultrapassa práticas religiosas e tem sido usado para fins recreativos por pessoas que procuram apenas os efeitos psicodélicos da infusão. Nota-se, porém, que a utilização do chá pelas três religiões ayahuasqueiras citadas é exclusivamente religiosa, não caracterizando abuso ou fins ilícitos apesar de não ser levado em consideração os possíveis efeitos tóxicos das substâncias presentes no chá por esses usuários.

1.2 Caracterização química e mecanismos de ação das substâncias presentes no chá de ayahuasca

O cipó *Banisteriopsis caapi*, da família *Malpighiaceae*, conhecido como mariri, nativo da Amazônia e dos Andes, contém os alcalóides β -carbolinas harmina (HRM), harmalina (HRL) e tetrahydroharmalina (THH) (Figura 3). A harmina e a harmalina possuem a capacidade de inibir reversivelmente a enzima monoamino oxidase (MAO), que desamina preferencialmente, a noradrenalina e a serotonina, mas também a dopamina. A tetrahydroharmalina tem a capacidade de inibir a recaptção de serotonina, além de inibir a MAO. A concentração desses alcalóides no chá de ayahuasca varia de 0,05% a 1,95% de peso seco (McKenna *et al.*, 1984; McKenna, 2004).

A ação conjunta destes mecanismos eleva os níveis de noradrenalina, serotonina e de dopamina na fenda sináptica (Cazenave, 2000; Callaway *et al.*, 1999, McKenna *et al.*, 1998; Luna, 2005). Segundo Brito (2004), as quantidades de β -carbolinas presentes em uma dose usual de ayahuasca estão abaixo do limiar de sua atividade alucinógena, que são de 300 a 500 mg para HRL e THH e de 100 mg para HRM, e por outro lado, estão acima do limiar para atividade como inibidora da MAO.

A planta *Psycotria viridis*, da família *Rubiaceae*, conhecida como chacrona, contém o alcalóide indólico N, N-dimetiltriptamina (DMT) (Figura 3), substância de estrutura molecular semelhante ao neurotransmissor serotonina (5-HT) (Figura 3). O DMT é um composto endógeno também metabolizado pelo MAO, potente alucinógeno, apresentando

ação agonista sobre os receptores de serotonina, principalmente do subtipo 5-HT₂ (Grella *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1998). A ingestão de DMT, também metabolizado pela MAO, geralmente altera a percepção da realidade com novas imagens mentais complexas (Holmsted & Lindgren, 1967; McKenna & Towers, 1984; McKenna *et al.*, 1984, 1990; Deliganis *et al.*, 1991; Strassman *et al.*, 1994). A concentração desse alcalóide no chá de ayahuasca varia de 0,1% a 0,66% de peso seco (McKenna *et al.*, 1984; McKenna, 2004).

O DMT, quando administrado pela via pulmonar (fumada) ou pela via intravenosa em humanos, foi capaz de produzir efeitos alucinógenos, quase imediatos (Oliveira *et al.*, 2010). Quando administrado por via oral, o DMT sofre ação da enzima MAO intestinal e hepática, sendo desaminado e degradado em metabólitos inativos, consequentemente inativado, impossibilitando seu acesso ao sistema circulatório. Porém, quando ingerido juntamente com as β -carbolicinas, combinação existente na ayahuasca, o DMT não sofre inativação pela MAO. O acesso do DMT ao sistema circulatório e ao sistema nervoso central (SNC) é então permitido, o que leva a sua chegada aos receptores serotoninérgicos (Callaway *et al.*, 1999). O resultado é uma cascata de efeitos neuroquímicos que irão alterar os padrões normais da percepção, sobre aquilo que comumente é compreendido como sendo “realidade” (De Souza, 2011).

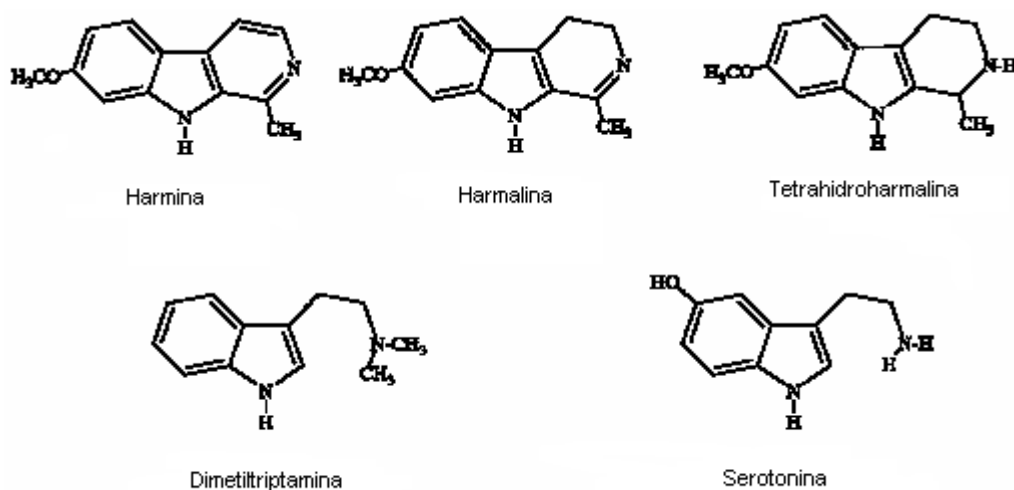


Figura 3. Estruturas químicas: harmina, harmalina, tetrahydroharmalina, N,N-dimetiltriptamina e serotonina.

Portanto, torna-se claro que a interação sinérgica do DMT e β -carbolicinas, presentes no chá de ayahuasca, permitem que as propriedades psicoativas da infusão se manifestem,

assim como sua efetiva ação farmacológica, visto que a bebida proporciona um aumento nas concentrações de serotonina e torna o DMT disponível por via oral (Callaway & Grob, 1998). Embora não se tenha relatos de mortes por intoxicação de β -carbolicinas Callaway *et al.* (1996) destaca que, como são potentes inibidores da MAO, podem causar reações adversas quando combinadas com medicamentos, que possuem tempo de meia-vida longo, incluindo os inibidores seletivos de recaptação de serotonina (SSRIs). O bloqueio da MAO juntamente com o decréscimo de recaptação pelos SSRIs pode levar a síndrome serotoninérgica. Sendo assim, com o aumento do uso de medicamentos SSRIs e o crescente interesse no chá de ayahuasca o risco de toxicidade aumentou nos últimos anos.

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um neurotransmissor produzido por descarboxilação e hidroxilação do aminoácido triptofano. Mais de 90% da 5-HT do organismo são encontradas nas células enterocromafins do trato gastrointestinal (TGI). Os neurônios serotoninérgicos do SNC localizam-se, predominantemente, nos núcleos medianos da rafe, desde o tronco cerebral até a medula, são esses que sintetizam, armazenam e liberam a serotonina como neurotransmissor (Katzung, 1998).

O neurotransmissor serotonina é um mediador de ampla variedade de funções fisiológicas e interage com múltiplos receptores, que desempenham um importante papel em condições patológicas e psicopatológicas (Glennon *et al.*, 2000). Nos últimos 16 anos, sete famílias distintas de receptores de 5-HT foram identificadas (5-HT1 a 5-HT7), com pelo menos 15 subpopulações destes receptores já foram clonados.

A 5-HT desempenha um papel importante nos mecanismos de humor, sono, vigília, termorregulação, vômito, percepção da dor, regulação da pressão arterial, entre outros. Em nível periférico está relacionada com o tônus muscular, vasodilatação, agregação placentária e inflamação. Pode estar envolvida, ainda, em condições patológicas, tais como depressão, ansiedade, pânico e enxaqueca (Katzung, 1998).

1.3 Efeitos biológicos do chá

Os efeitos neuroquímicos observados por usuários do chá de ayahuasca incluem palidez, sudorese, midríase, salivação, náuseas, vômitos, diarreia, hipertensão, palpitação, taquicardia, tremores, excitação e alteração na temperatura corpórea (Shanon, 2003, Riba *et al.*, 2001). Também são relatados ansiedade, delírios parecidos com sonhos, sensação de vigilância e estimulação, alterações no processo de pensamento, concentração, atenção, memória e julgamento, alteração da percepção da passagem do tempo, mudanças na

percepção corporal, alterações na expressão emocional, mudanças no significado de experiências anteriores (“*insights*”), sentimentos de rejuvenescimento, sensação da “alma se desprendendo do corpo“, sensação do contato com locais e seres sobrenaturais e alterações perceptuais atingindo vários sentidos, onde alucinações e sinestias são comuns, em alguns casos perda de memória, confusão mental e desorientação (Cazenave, 1996; Costa, *et al.*, 2005; Callaway, 1999; Shanon, 2003; Schvartsman, 1992; Schultes & Hofmann, 1992; Pires, *et al.*, 2010; de Souza, 2010; Vinha, 2005; Santos, 2004; Riba, *et al.*, 2001).

O uso do chá pode levar a desidratação e descompensação eletrolítica, por conta das náuseas, vômitos e diarreia, efeitos que podem estar associados à ação no receptor de serotonina 5-HT₂ (Costa *et al.*, 2005). Os sintomas podem ser agravados em doses altas e levar a uma síndrome serotoninérgica, que se caracteriza por uma estimulação excessiva dos receptores de serotonina no organismo (Costa *et al.*, 2005; Callaway *et al.*, 2005). A Figura 4 mostra as principais manifestações clínicas observada numa crise serotoninérgica.

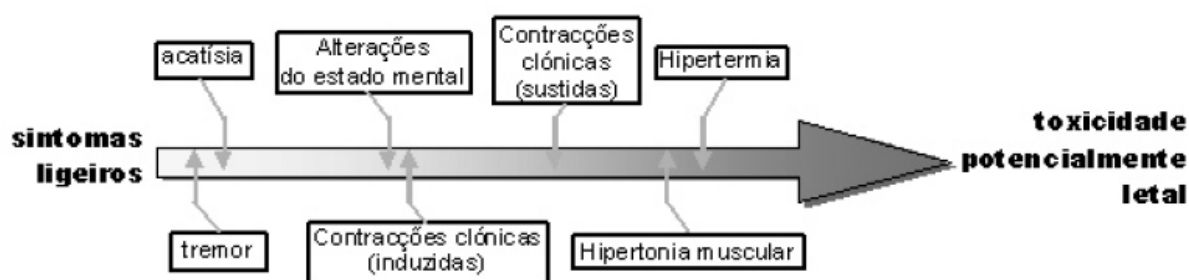


Figura 4. Manifestações clínicas da síndrome serotoninérgica.

Os efeitos somáticos do chá de ayahuasca aparecem entre 15 e 30 minutos, os psicológicos entre 30 e 60 minutos, ambos com atuação máxima entre 60 e 120 minutos após a ingestão, (Riba *et al.*, 2001). Vale destacar que os efeitos somáticos e psíquicos estão diretamente relacionados à pré-disposição fisiológica do indivíduo, dose e composição do chá (alcalóides e DMT). Segundo de Souza (2011), o nível de estruturação sócio-familiar, o contexto no qual este indivíduo teve a experiência, a história pessoal e o grau de vulnerabilidade física e emocional de cada indivíduo são elementos importantes durante as alterações de consciência causadas pelas substâncias psicoativas.

Um estudo conduzido por Callaway *et al.* (1999) relatou resultados das medidas de concentrações plasmáticas dos alcalóides e de DMT de voluntários que ingeriram o chá de

ayahuasca em uma cerimônia religiosa. As concentrações plasmáticas máximas (Cmx) do DMT, THH, HRM, HRL, coincidiram com os efeitos mais agudos sentidos pelos usuários. Os efeitos subjetivos foram avaliados através da escala HRS (*hallucinogen rating scale*) que permite medir os níveis de alucinação. Corroborando esse estudo Riba *et al.* (2003) também relatou a culminância do Cmx com os efeitos subjetivos, tais como: cognição, sensibilidade a reações emocionais, percepção visual, experiências auditivas, gustativas e olfativas.

1.4 Potencial terapêutico

A investigação de plantas psicoativas e seus mecanismos de ação têm fornecido *insights* sobre a neuroquímica de muitas doenças do sistema nervoso central, bem como a química da consciência (O'Connor & Roth, 2005).

As tribos indígenas usuárias do chá de ayahuasca, a um período bastante longo de tempo, utilizam o chá como elemento de proteção e cura de inúmeras doenças, o que levantou questionamentos dos cientistas a cerca desta nova função das substâncias ativas presentes na infusão (Desmarchelier *et al.*, 1996). Diversas tribos indígenas da Amazônia utilizam o chá para curar doenças parasitárias e gastrointestinais comuns nos trópicos (Pomilio *et al.*, 1999).

O primeiro estudo sobre as propriedades terapêuticas dos componentes da ayahuasca foi realizado em 1928 pelo neurologista Kurt Bheringer, que testava o extrato do cipó mariri no tratamento da doença de Parkinson. A doença é causada pela perda de neurônios, que uma vez danificados param de produzir neurotransmissores (dopamina) e comprometem a capacidade do cérebro de controlar os movimentos. Ainda não se sabe ao certo o que danifica esses neurônios em pacientes com Parkinson, mais sabe-se que os radicais livres tem essa função. Sendo assim, antioxidantes, agonistas de dopamina ou inibidores da MAO podem atuar fornecendo proteção contra a neurodegeneração, tendo importante papel no tratamento da doença (Samoylenko *et al.*, 2010).

Um estudo conduzido por Serrano-Dueñas *et al.* (2001), utilizou *Banisteriopsis caapi* em pacientes com doença de Parkinson e obteve melhora significativa na função motora, sugerindo assim a utilização desta planta no tratamento desses pacientes (Samoylenko *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; O'Connor & Roth, 2005).

Há um crescente interesse na aplicação médica da ayahuasca incluindo suas propriedades antioxidantes, antimutagênicas e antígenotóxicas (Moura *et al.*, 2007). Além disso, existem sugestões dos efeitos psicoterapêuticos e na reabilitação de doenças como

alcoolismo (McKenna, 2004), comportamento violento, comportamento suicida, ansiedade fóbica e depressão grave (McIlhenny *et al.*, 2011; Grob *et al.*, 1996; Halpern, 2004). Sugere-se também um potencial terapêutico bioquímico já que há uma regulação do número de recaptação de serotonina em plaquetas sanguíneas (McIlhenny *et al.*, 2009).

A diminuição de 5-HT está associada a uma variedade de distúrbios funcionais, comportamentais e doenças neurodegenerativas, variando do alcoolismo a depressão, autismo, esquizofrenia, déficit de atenção, hiperatividade e doenças senis. O uso regular e em longo prazo do chá de ayahuasca resulta na modulação da serotonina. Os transportadores de 5-HT são significativamente elevados nos usuários do chá de ayahuasca, sendo assim, existe a especulação que o uso da infusão possa reverter os déficits de serotonina e assim controlar essas doenças além de promover positivas mudanças comportamentais (McKenna, 2004).

A esquizofrenia é um transtorno mental de alta complexidade por sua ação multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais. A doença se caracteriza por uma ampla desordem mental que pode ser causada por perturbações enzimáticas. A teoria da transmetilação na patologia da esquizofrenia postula uma diminuição na atividade da MAO resultando em um acúmulo de alcalóides indólicos aminas (AIA) como 5-metoxi-N,N-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT), DMT e bufotenina, fortes alucinógenos. Na verdade, os AIA são compostos que estão relacionados com distúrbios perceptivos, desempenhando papel de “marcadores de estado” para psicoses (Pomilio *et al.*, 1999). O acúmulo de AIA em pacientes com psicoses pode ser causado por aceleração na cinética de sua produção ou por uma diminuição na cinética da MAO. Os AIA atravessam a barreira hemato-encefálica e atuam no SNC provocando as alucinações características da doença. Um estudo conduzido por Pomilio *et al.* (1999) encontrou níveis muito semelhantes de DMT na urina de usuários do chá de ayahuasca e de pacientes não medicados com esquizofrenia aguda, o que pode indicar que o chá de ayahuasca reproduz a condição patológica da doença.

A 5-HT desempenha um importante papel no tratamento dos distúrbios psiquiátricos incluindo a depressão, o que está relacionado ao grande número de fármacos inibidores seletivos de recaptação de serotonina prescritos para o tratamento deste distúrbio psíquico, já que bloqueiam a recaptação de serotonina nos terminais sinápticos resultando em uma elevada concentração extracelular de serotonina (Cryan & Lucki, 2000).

Vários estudos tem relatado o papel terapêutico do chá de ayahuasca no tratamento da depressão. Um estudo conduzido por Santos *et al.* (2007), além de investigar o papel

positivo do referido chá na depressão, também relatou a positividade do uso no estado de ansiedade e pânico. Todos os participantes relataram melhora na saúde física e mental além das relações interpessoais no trabalho e na família. Vale destacar que muitos medicamentos prescritos, eficazes ansiolíticos, importantes no tratamento antidepressivo e antipânico atuam exatamente inibindo a recaptção de serotonina, mesmo mecanismo do chá de ayahuasca. Estudos de clonagem de genes transportadores de monoamina em camundongos *knockout* tem sido importantes para investigar o papel de transportadores na regulação das funções neurotransmissoras e suas ligações com distúrbios neurobiológicos e comportamentais (McKenna, 2004).

1.5 Potencial toxicológico

Todas as substâncias químicas são tóxicas em certas condições de exposição, no entanto, para toda substância deve haver alguma condição de exposição que seja segura no que se refere à saúde humana.

O chá de ayahuasca é definido como uma substância (bebida) psicoativa que segundo a Secretaria Nacional Antidrogas (2004) é qualquer substância química, natural ou sintética, proscrita ou não, que altera o comportamento, o humor e a cognição, agindo preferencialmente nos neurônios, afetando o SNC.

Segundo Costa *et al.*, (2005) deve-se levar em consideração dois tipos de uso para substâncias psicoativas: o recreativo, caracterizado pelo uso esporádico e o abusivo, definido como intenso, ocupando espaço maior na vida do indivíduo, prejudicando-o em algumas situações como a tolerância, dependência e compulsão em relação à substância. A utilização do chá de ayahuasca pelos adeptos da UDV é exclusivamente religiosa, não caracterizando abuso ou fins ilícitos, podendo ser classificada como recreativa.

A avaliação da toxicidade de uma substância é realizada com o objetivo de prever os efeitos nocivos que a mesma poderá desencadear a exposição humana pelas diversas vias (Cazarin *et al.*, 2004). Esta compreende a análise de dados toxicológicos de uma substância química com o objetivo de classificá-la em categorias toxicológicas e, ao mesmo tempo, fornecer informações a respeito da forma correta e segura de uso, bem como medidas de prevenção e tratamento.

Para estudar o potencial tóxico de uma substância química é preciso, além de estabelecer uma relação dose-resposta, proceder à realização de testes de toxicidade. Os testes que avaliam a toxicidade aguda são utilizados para classificar e apropriadamente

rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação-dose resposta (Valadares, 2006).

Em 1927 o teste de dose letal aguda (DL_{50}) foi introduzido na comunidade científica com o objetivo de classificar as substâncias, de acordo com sua toxicidade, (Valadares, 2006). Esse teste era um pré-requisito para várias agências reguladoras, como a americana *Food and Drugs Administration* (FDA), responsáveis pela aprovação de novos fármacos, aditivos alimentares, ingredientes cosméticos, produtos domésticos, químicos industriais e pesticidas. A DL_{50} é definida como a concentração de uma substância capaz de matar 50% da população de animais testados. Para realização do teste da DL_{50} eram empregados 40 animais para cada espécie estudada (normalmente ratos e camundongos) e para cada substância testada.

Estudos para determinar a toxicidade letal do chá da ayahuasca e seus componentes bioativos são escassos na literatura. Nenhum estudo determinou diretamente a toxicidade oral. Gable (2007) estimou que a DL_{50} intravenosa do DMT em camundongos é 1,6 mg/kg de peso corpóreo (p.c.), o que corresponde a aproximadamente 112 mg para uma pessoa de 70 kg. Levando em consideração o método de administração, e assumindo que a biodisponibilidade oral de uma substância é cinco vezes menor que quando administrada de maneira intravenosa, este pesquisador estimou que a DL_{50} oral do DMT seria em torno de 8.0 mg/kg, ou seja, que a dose letal aguda da ayahuasca em humanos seria de aproximadamente 20X a dose usada durante a cerimônia religiosa.

Lima *et al.* (2006) administraram diferentes doses de ayahuasca (fornecido pela UDV de Vitória, ES) em camundongos machos que corresponderam a 1; 2,5; 5; 10; 20 e 25 mg/kg p.c. de DMT. Os autores estimaram uma DL_{50} de 19 mg/kg p.c. de DMT, porém, foi realizada apenas uma análise qualitativa para confirmar a presença dos alcalóides na infusão, e não existe informação sobre a quantidade administrada aos animais.

Um estudo conduzido por Brito *et al.* (1994) concluíram que uma dose de 500 mg/kg p.c. de chá de ayahuasca administrado em ratos não produz dano neurológico, e que os efeitos observados nos animais foram similares aqueles produzidos por drogas que elevam os níveis de serotonina no SNC.

A DL₅₀ via subcutânea da harmina e harmalina em ratos foram determinadas como 120 e 200 mg/kg p.c., e a DL₅₀ intravenosa da harmina em camundongos foi definida como 38 mg/kg p.c. (Mahmoudian *et al.*, 2002).

A Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development - OECD*), com o objetivo de garantir confiabilidade nos testes, organizou inúmeras diretrizes visando à redução do número de animais utilizados nesses testes, assim como a garantia de bem-estar desses. Novos protocolos foram aprovados com a utilização de um número mínimo de animais necessário para caracterizar a substância de acordo com seu potencial letal, sem especificamente determinar a DL₅₀. O método de classificação de toxicidade aguda estabelecido na orientação OECD-423 é um procedimento gradual com a utilização de três fêmeas por etapa com administração de uma única dose oral. Dependendo da mortalidade e / ou morbidade dos animais, em média, 2-4 etapas podem ser necessárias para permitir avaliar a toxicidade aguda de uma substância teste (Figura 5). No caso deste projeto cada dose foi testada duas vezes e, finalmente, foi estimada a categoria toxicológica do chá de ayahuasca. Este procedimento é reproduzível, utiliza poucos animais e permite classificar as substâncias de um modo semelhante a outros métodos de ensaio de toxicidade aguda (Guia de Teste 420 e 425).

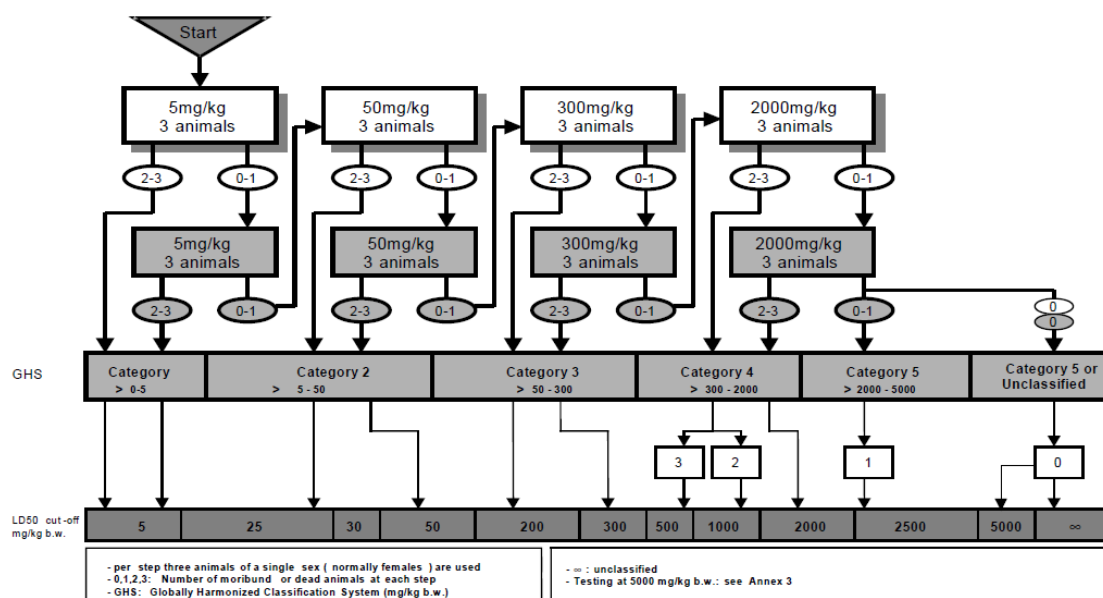


Figura 5. Protocolo de “Toxicidade Aguda de Classe” (Guia da OECD 423, 2001). De acordo com o resultado do teste na dose inicial selecionada, ele é repetido em uma dose maior ou menor.

1.5.1 Estudos de neurotoxicidade e testes de comportamento

O campo da neurotoxicologia surgiu a partir da interação da toxicologia farmacológica, psicofarmacologia e da psicologia experimental e envolve o estudo das alterações na função ou estrutura do sistema nervoso como resultado da exposição aos agentes químicos, biológicos ou físicos. As alterações histopatológicas definiam o campo da neurotoxicologia e existia a constatação de que as substâncias tóxicas também podem alterar o SNC como, por exemplo, o comportamento. Efeitos comportamentais podem ser um reflexo das mudanças na comunicação e interatividade das células nervosas (Moser, 2011).

Vários testes foram desenvolvidos para avaliar o efeito de substâncias psicoativas no comportamento de animais de experimentação. Dentre estes podemos destacar o teste de campo aberto, labirinto em cruz elevado e natação forçada. A maioria dos autores concorda que nenhum dos testes comportamentais que avaliam a ansiedade, fornecem uma medida pura e indiscutível da reatividade emocional animal. Cada teste individual avalia apenas uma fração do perfil emocional de um animal (Ramos *et al.*, 2008).

Campo Aberto: Esse teste é muito utilizado como parâmetro de locomoção e de ansiedade animal, que é descrita como um estado comportamental induzido por uma ameaça ao bem-estar ou sobrevivência real ou potencial (Steiner, 2011). A ansiedade pode ser caracterizada pelo aumento da excitação, expectativa, ativação autonômica e neuroendócrina e padrões específicos de comportamentos. Hall (1934) foi o primeiro a descrever esse teste para estudos de emotividade em ratos. O aparelho original consistia em uma arena circular bem iluminada de 1,2 m de diâmetro e fechada por paredes de 0,45 m de altura. Um exemplo de uma arena para realização de um teste de campo aberto está representado na Figura 6.

O procedimento consiste em confrontar o animal por 5 minutos com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção, autolimpeza (*grooming*), defecação, urina, tempo gasto na área central. De fato, os roedores parecem preferir a parede do aparelho, comportamento conhecido como tigmotismo. Tem sido proposto o emprego deste modelo na avaliação da ansiedade, considerando-se que um aumento na ambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade. De fato a ansiedade no campo aberto é acionada por dois fatores, o teste individual (o animal é separado do seu grupo) e a agorafobia (a arena é grande em relação ao animal), e esses fatores influenciam diretamente nesses animais, visto que, eles vivem em pequenos grupos e em túneis (Prut & Belzung, 2003). Portanto, tratamentos ansiolíticos não

aumentam a exploração do campo e sim diminuem o estresse induzido no comportamento de exploração.

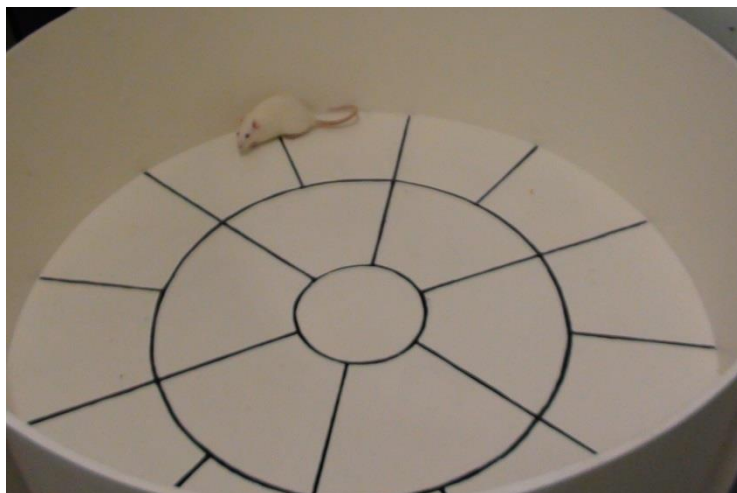


Figura 6. Aparelho utilizado para teste de campo aberto.

Labirinto em Cruz Elevado (LCE): O LCE é largamente utilizado como modelo de ansiedade animal. O teste é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos, onde o animal se confronta em impulso de explorar novos ambientes e a tendência em evitar áreas potencialmente perigosas. Montgomery (1958) foi o primeiro a comprovar esse fato em testes com labirinto em Y em que conseguiu mostrar perfeitamente que os animais saudáveis preferiam permanecer nos braços fechados.

Os estudos iniciais com o LCE foram realizados por Handley & Mithani (1984), quando investigavam uma variedade de agonistas e antagonistas alfa-adrenérgicos. O equipamento original situava-se 70 cm acima do solo e apresentava dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares, cada qual medindo 45 x 10 cm. Os braços fechados também apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. A Figura 7 ilustra um equipamento para a realização do teste. O comportamento animal é observado por 5 minutos e os parâmetros avaliados incluem o número de entradas nos braços abertos, o número de entradas nos braços fechados, o tempo gasto nos braços abertos (incluindo a praça central), o tempo gasto nos braços fechados, números de defecação, número de micção e *grooming*.

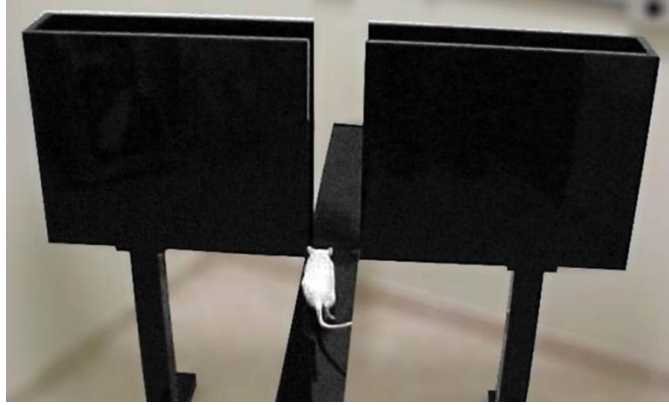


Figura 7. Aparelho utilizado para teste de labirinto em cruz elevada.

Natação Forçada: O primeiro a descrever o teste de natação forçada em ratos foi Porsolt *et al.* (1978), também chamado de *behavioral despair test*. Nesse protocolo, os animais são treinados para o nado por 15 minutos e após 24 horas, a substância em estudo é administrada. Uma hora depois, os animais são colocados para nadar por 5 minutos e analisados quanto ao tempo de natação e imobilidade. Destaca-se que por motivos ainda não conhecidos pela comunidade científica os camundongos não precisam da realização deste treino. O potencial antidepressivo da droga é caracterizado pelo aumento da mobilidade. A imobilidade observada em animais controle ou expostos a substâncias sem atividade antidepressiva pode ser vista como meio de conservar energia, falha na persistência em escapar, desespero comportamental (Petit-Demouliere *et al.*, 2005; Cryan *et al.*, 2002; Castangné *et al.*, 2009).

A Figura 8 mostra um animal sendo submetido a um teste de natação forçada. Alguns autores modificaram o protocolo de Porsolt, avaliando os animais a cada 5 segundos ao longo dos 5 minutos de teste em relação aos parâmetros natação, imobilidade e *climbing* (Cryan *et al.*, 2002; Cryan & Slattery, 2012). Numa outra modificação do protocolo de Porsolt, a fase de treinamento (adaptação) 24 horas antes do teste foi eliminada, ocorrendo nos dois minutos iniciais do teste (Lucena *et al.*, 2010; Taiwo *et al.*, 2012). Em todos os protocolos, animais tratados com substâncias com potencial antidepressivo nadam por mais tempo e persistem na tentativa de fuga (*climbing*).



Figura 8. Aparelho utilizado para teste de natação forçada.

Um estudo conduzido por Oliveira *et al.* (2011) foi realizado com a administração oral do chá de ayahuasca na dose de 1X (admitindo que uma pessoa de 70 kg ingere 100 ml de chá) com o intuito de investigar os efeitos neurotóxicos da infusão durante a gestação e lactação. A administração ocorreu do 6º dia de gestação até o dia 10 de lactação. Os testes de campo aberto, labirinto em cruz elevada, interação social, natação forçada (Porsolt, 1978) e catalepsia foram realizados nas proles.

Não foram encontradas diferenças significativas em relação ao ganho de peso e consumo de alimento nas mães expostas ao chá. Em relação aos testes neurocomportamentais foi relatado nos animais tratados uma diminuição na distância percorrida e velocidade na área central no teste de campo aberto, houve aumento na entrada nos braços abertos no teste de labirinto em cruz elevado, não foi observada diferença no tempo de imobilidade, mas foi observada uma diminuição no tempo de latência para iniciar a flutuação no teste de natação forçada e no teste de interação social houve uma significativa redução no tempo de interação dos indivíduos tratados e não houve alteração do comportamento estereotipado. Sendo assim, a administração do chá de ayahuasca durante a gestação e lactação produziu diminuição da ansiedade e motivação social na prole das mães exposta ao chá de ayahuasca durante a gestação e lactação.

A principal característica das doenças neurodegenerativas agudas e crônicas é a morte celular excessiva. A apoptose é um processo fisiológico que está relacionado ao

desenvolvimento celular no sistema nervoso, já que os neurônios inativos ou defeituosos morrem desde o período do nascimento (Figueroa, 2012). A apoptose é um processo de morte celular bem definido e com características morfológicas marcantes e coordenadas, que acontece em pouco tempo (Bullitt, 1990).

O estudo conduzido por Figueroa (2012) foi realizado com ratos *Wistar* machos tratados oralmente com chá de ayahuasca durante três semanas. Houve aumento significativo nos valores de ureia urinária, podendo ser um indicativo de dano renal nos animais tratados. O cérebro foi fixado para cortes histológicos da região hipocampal e realização do ensaio TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), indicador de dano ao DNA e Caspase 3, indicador de apoptose neural. O teste TUNEL indicou diferença significativa com relação ao controle, porém, não se confirmou dano neural mais severo pelo ensaio da Caspase 3.

Existe uma controvérsia entre os pesquisadores a respeito da dependência e tolerância ao DMT. Alguns autores não observaram efeitos de abstinência ao DMT ou dependência fisiológica e tolerância (Gatch, 2009; Fábregas *et al.*, 2010; Callaway, 2005). Fábregas *et al.* (2010) realizou um estudo com uso contínuo do chá de ayahuasca em usuários de longa data e observou que, de acordo com as escalas de estudos psiquiátricos (*Medical Status and Psychiatric Status*), a ayahuasca tem um baixo potencial de abuso e não foram encontrados distúrbios neuropsiquiátricos nem psicopatológicos, corroborando os estudos de Grob *et al.* (1996).

1.5.2 Toxicologia reprodutiva

O nascimento de crianças malformadas atrai a atenção da humanidade. Esse fato é evidenciado pelo grande número de esculturas, pinturas e desenhos que registram seres bizarros e indivíduos portadores de malformações congênitas. O mais antigo deste registro, uma estátua de mármore representando uma divindade de duas cabeças, encontrada na Turquia, data de 6.500 a.C. A investigação experimental dos agentes causais da teratogênese é relativamente recente. Acreditava-se no meio científico que, protegidos no interior do útero materno, o desenvolvimento do embrião de mamíferos estaria a salvo de fatores ambientais adversos (Miranda *et al.*, 2003).

As primeiras constatações de que fatores ambientais poderiam causar anomalias ao desenvolvimento embrio-fetal em mamíferos surgiram em 1930, a partir das investigações dos efeitos de deficiências nutricionais maternas. Hale (1935) constatou o aparecimento de

malformações (anofthalmia e fenda palatina) em porcos nascidos de mães com deficiência em vitamina A. O vírus da rubéola foi o primeiro agente ambiental a ser identificado como causa de malformações humanas. A infecção de mulheres grávidas levava ao surgimento de anomalias oculares, cardiovasculares, auditivas e auriculares, além de retardo mental nos filhos expostos *in utero* (Gregg, 1941). A rubéola foi reconhecida como teratogênica apenas após o episódio conhecido como “tragédia da talidomida”, um medicamento introduzido no mercado em 1950 e utilizado por mulheres grávidas para combater o enjoo. As malformações observadas em crianças expostas *in utero* à talidomida incluíam encurtamento pré-axial e ou ausência de membros. Este evento revelou definitivamente para a comunidade científica a vulnerabilidade do desenvolvimento embrionário humano aos agentes ambientais e as substâncias químicas (Manson, 1986).

A toxicologia reprodutiva investiga os efeitos adversos na capacidade reprodutiva de um organismo e no desenvolvimento da prole. Os efeitos adversos incluem alterações no sistema reprodutivo, produção e transporte de gameta, ciclo reprodutivo, fertilidade e incidência de partos prematuros. Os efeitos adversos nas proles incluem aqueles ocorridos antes ou depois do nascimento, resultando da exposição parental antes da concepção e durante o período do desenvolvimento pré-natal. Estes efeitos podem ser manifestados em qualquer momento de vida do organismo e inclui morte, anormalidade estrutural, alteração de crescimento e deficiência funcional (OECD, 2004).

A gestação de mamíferos pode ser dividida em três períodos: pré-implantação, organogênese e fetal (Fritz & Giese, 1990). A fase da pré-implantação compreende o período que vai desde a fecundação até o início da implantação do blastocisto no útero, que na espécie humana e em ratos este período dura até o 6° dia após a fecundação (Moore & Persaud, 2008). Esta fase é caracterizada pela presença de células totipotentes em divisão e a exposição a um agente tóxico pode impedir a implantação do blastocisto, levando a um aborto espontâneo. A implantação termina ao final da segunda semana após a fecundação. Após a implantação inicia-se a organogênese, que na espécie humana inicia-se na terceira semana pós-fecundação e vai até o 57° dia de gestação. Nos ratos este período vai do 7° ao 14° dia de prenhez. Esse período é caracterizado por uma intensa proliferação e migração celular. A organogênese é o período de maior susceptibilidade a ação de agentes teratogênicos e embriofetotóxicos, no qual o maior número de malformações pode ser induzido (Brent, 1993).

A fase fetal é caracterizada por diferenciação e crescimento tissular e maturação fisiológica dos diferentes sistemas. Em humanos compreende o período que vai do 57° dia pós-fertilização até o término da gestação e em ratos do 16° até o 21° dia. Nesse período a sensibilidade a malformações anatômicas é baixa, porém a exposição a agentes químicos pode produzir morte celular e inibição da divisão celular.

As atuais diretrizes internacionais da agência de controle de medicamentos e alimentos FDA e ECC (*European Economic Community*) recomendam a realização de estudos de toxicidade reprodutiva em três segmentos:

➤ **Segmento I:** São estudos que avaliam efeitos sobre a fertilidade e o desempenho reprodutivo geral, de machos e fêmeas. Os animais são expostos pela via preconizada para o uso humano e, no mínimo, três doses são testadas. Os machos são tratados por 90 dias antes do cruzamento e as fêmeas 21 dias antes do acasalamento, o que expõe número suficiente de gametas durante o período de espermatogênese e ovogênese. Os machos são eutanasiados e necropsiados depois do cruzamento, e seus órgãos reprodutivos analisados, enquanto as fêmeas continuam sendo tratadas durante a gravidez. Ao fim da gestação, metade das fêmeas é submetida à cesariana e o restante prossegue para o parto natural, e continua a receber a substância teste durante a lactação até o desmame da prole, no 21° dia de vida pós-natal. Nesse segmento são analisados fertilidade, frequência de malformações de vísceras e esqueletos dos fetos obtidos por cesárea, e o desenvolvimento pós-natal da prole exposta.

➤ **Segmento II:** Estudos de embriofetotoxicidade ou teratogenicidade são realizados neste segmento. Este investiga especificamente os efeitos adversos sobre a organogênese ou embriogênese. O tratamento inclui o período da organogênese, que no rato vai do 6° dia, quando ocorre a implantação, ao 15° dia de gestação ou 20° dia. No Guia OECD 414, o protocolo de segmento II inclui a administração até o final da gravidez (normalmente 20° dia de prenhes (OECD, 2001). No 21° dia os fetos obtidos por cesárea são examinados para verificação de ocorrências de malformações externas, 1/3 dos animais de cada ninhada, escolhidos ao acaso, são fixados para as análises viscerais e os 2/3 restantes são diafanizados e corados para as análises de anormalidades esqueléticas. Devem ser empregadas três doses e tratadas pelo menos 20 fêmeas por dose.

➤ **Segmento III:** Estudos dos efeitos adversos sobre o período peri-natal, parto e desenvolvimento pós-natal da prole. No rato o tratamento tem início no 15° dia de gestação, prossegue durante o parto e continua até o desmame da prole, por volta do 21° dia de vida pós-natal. Problemas durante o trabalho de parto, a sobrevivência no período neonatal e o

malformações viscerais e esqueléticas. Os autores concluíram que o chá de ayahuasca é tóxico para o organismo materno, e possuiu efeitos teratogênicos, apresentando risco para os humanos expostos. Eles não contextualizaram os resultados encontrados em relação ao consumo religioso do chá, que ocorre a cada duas semanas para a maioria dos usuários, o que foi criticado por outros autores (Santos, 2010).

2 - OBJETIVOS

Objetivo Geral:

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda, reprodutiva e neurotoxicidade do chá de ayahuasca em ratos *Wistar*.

Objetivos Específicos:

1. Estimar a dose aguda letal do chá ayahuasca em ratos;
2. Avaliar os efeitos toxicológicos comportamentais e neurotoxicidade em ratos expostos ao chá ayahuasca;
3. Avaliar o índice reprodutivo e a toxicidade fetal de ratas expostas ao chá ayahuasca;
4. Investigar a embriofetotoxicidade do chá ayahuasca por meio da análise da ocorrência de embriofetotoxicidade, retardo do crescimento e aparecimento de malformações viscerais esqueléticas na prole exposta ao chá de ayahuasca *in utero*.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Chá ayahuasca

O chá de ayahuasca utilizado para o tratamento dos animais deste trabalho foi cedido pelo grupo União do Vegetal com sede em Brasília-DF. O cipó mariri (*Banisteriopsis caapi*), utilizado na preparação do chá, foi coletado da chácara em Águas Lindas de Goiás, Quadra 24, Lote 269, Jardim Guairá (15 ° 46 ' 17 "S, 48 ° 14' 56" W). Folhas do arbusto chacrona, *Psychotria viridis*, foram coletadas em Sobradinho, Distrito Federal, Núcleo Rural Euler Paranhos, na rodovia DF-250 Km3 (15 ° 75 ' 23 "S, 47° 72' 92" W). As amostras das espécies foram depositadas como exsiccatas no *Herbarium* da UnB com os números de referência Azevedo EP 149880 Brahms e Trieto B 149.879 BRAHMS, respectivamente.

O preparo do chá de ayahuasca (vegetal) é realizado periodicamente por cada Núcleo da União do Vegetal (UDV) e o chá produzido (geralmente acima de 40-50 L) é armazenado assepticamente e mantido sob refrigeração para consumo nos rituais quinzenais. Em maio de 2011, o grupo do Laboratório de Toxicologia da UnB envolvido neste projeto participou de uma sessão de preparo do Núcleo Luz do Oriente, que cedeu aproximadamente 30 litros do chá preparado para a realização do projeto. O material, armazenado em frascos de 2L, foi mantido no freezer a -20°C do LabTox até sua utilização. Cerca de 10L deste material foram liofilizados (Liotop L101), fornecendo material seco que foi diluído em água para preparação das doses de administração ao longo do projeto. Volumes previamente aferidos foram liofilizados para determinar a densidade do material, que foi estimada como 0,16 g/mL. As doses selecionadas para este estudo foram baseadas na dose habitual consumida durante um ritual UDV, de 150 mL por um indivíduo de 70 kg.

3.1.1 Caracterização química

Os níveis de DMT, harmina e harmalina presentes no chá de ayahuasca foram determinados por GC-MS/MS (Trace GC Ultra coupled with a TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole; Thermo Scientific). Padrões de harmalina (99.2% pureza) e harmina (98% pureza) foram obtidos da Sigma Aldrich. Por ser uma substância proscrita no Brasil e em diversos países no mundo, não foi possível a aquisição comercial do DMT, que foi sintetizado pela Prof^a. Maria Lucília Santos, do Instituto de Química da UnB, seguindo os procedimentos de Qu *et al.* (2011). A identidade e pureza deste padrão foi determinada por GC-MS/MS, ¹H and ¹³C-NMR (Varian Mercury Plus spectrometer 7.05 T operating at 300 MHz for ¹H and at 75.46 MHz for ¹³C) e LC-MSD TOF (Agilent 1100 Series).

A Figura 10 ilustra o cromatograma e o espectro de massa do DMT obtido por CG-MS/MS.

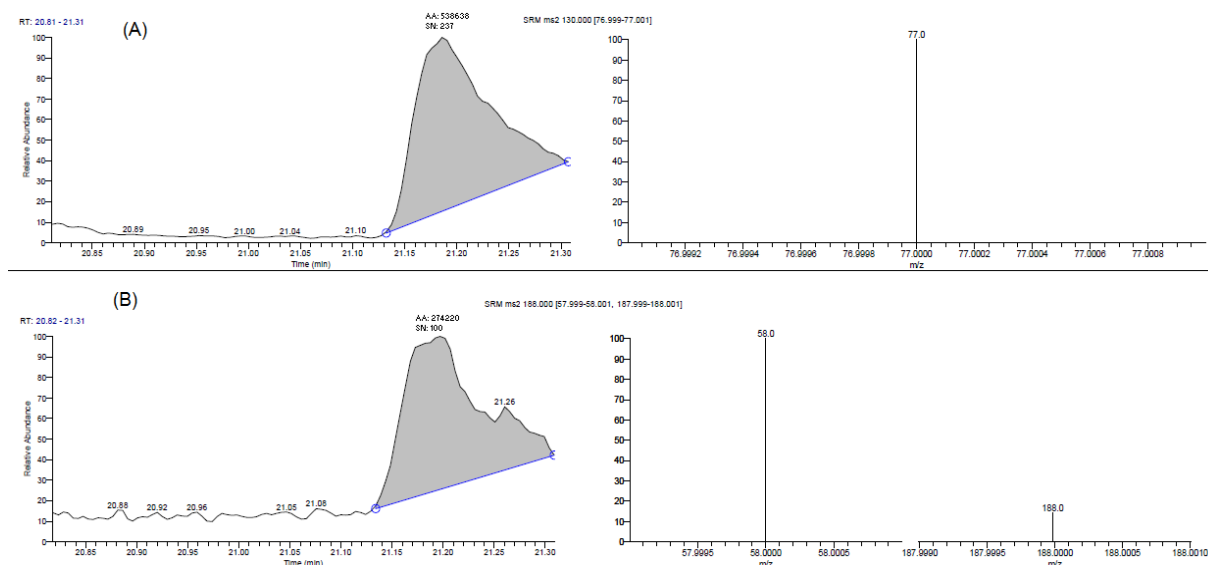


Figura 10: Cromatograma e espectro de massa do padrão sintetizado de DMT. (A) Íon de Quantificação. (B) Íons de confirmação.

A análise quantitativa do chá ayahuasca obtido da União do Vegetal indicou a presença de 0.146 mg/mL de DMT, 1,56 mg/mL de harmina e 0,12 mg/mL de harmalina.

3.2 Animais

Os experimentos deste projeto foram realizados com ratos Wistar (*Rattus norvegicus* Wistar) com idade entre 9 e 12 semanas e com variação máxima de peso de 20%, provenientes da Granja R.G.com sede em São Paulo. Os animais foram aclimatados no biotério da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, por um período de 15 dias, mantidos em grupos de três, em caixas de polipropileno e tampa de aço inoxidável com cama de maravalha de pinho branco, em condições controladas de luminosidade (12h/12h, claro/escuro), temperatura ($23 \pm 2^\circ \text{C}$) e umidade relativa (70%). Receberam água potável e ração comercial Purina[®] *ad libitum*. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnBdoc número: 107766/2010).

4- RESULTADOS

Os resultados deste estudo estão apresentados nessa dissertação em dois capítulos:

Capítulo I *Acute oral toxicity and neurotoxic potential of the ayahuasca infusion (banisteriopsis caapi and Psychotria viridis) in female Wistar rats.*

Os resultados apresentados neste capítulo atendem aos objetivos 1 e 2 deste estudo, e serão submetidos para publicação na língua inglesa em revista internacional indexada.

O Capítulo II **Toxicidade reprodutiva do chá ayahuasca em ratas Wistar**

Os resultados apresentados neste capítulo atendem aos objetivos 3 e 4 deste estudo.

CAPÍTULO I

ACUTE ORAL TOXICITY AND NEUROTOXIC POTENTIAL OF THE AYAHUASCA INFUSION (*Banisteriopsis caapi* and *Psychotria viridis*) IN FEMALE WISTAR RATS

Abstract

Ethnopharmacological relevance: Ayahuasca, a psychoactive beverage used by indigenous and religious groups, is generally prepared by the coction of *Psychotria viridis* and *Banisteriopsis caapi*, plants containing N,N-dimethyltryptamine (DMT) and β -carboline alkaloids, respectively.

Material and Methods: Ayahuasca infusion was administered by oral gavage to female Wistar rats at doses of 30 (30X) and 50 (50X) times the usual dose taken during a *União do Vegetal* (UDV) religious ritual. Behavioural functions were investigated one hour after dosing using the open field, elevated plus maze and forced swimming tests, with animals observed for lethality and other toxic effects for up to 14 days. In a separate experiment, neuronal activation and toxicity were investigated in dorsal raphe nuclei, amygdaloid nucleus and hippocampal formation brain regions of 30X treated animals.

Results: The lethal oral dose of the ayahuasca infusion for Wistar rats was found to be higher than 50X the usual dose, or higher than 15.1 mg/kg bw DMT. The two animals that died showed characteristic symptoms of 5-HT behavioral syndrome. Treated animals showed a significant decrease in locomotion in the open field and elevated plus maze tests. Results of the forced swimming test (higher swimming time and climbing) suggested that ayahuasca has an antidepressant effect. Neuronal activation, indicated by higher *c-fos* marked neurons, was significantly increased in all investigated brain areas of treated animals compared to the controls. Fluoro-Jade B neuron staining of the brain areas analyzed indicated brain injury in the treated animals, especially in the DRN.

Conclusions: Various studies have demonstrated the safety of ayahuasca in ritual use. However, the results of this study suggest that caution should be exercised when the infusion is taken at a much higher dose for recreational purposes.

Keywords: ayahuasca; acute doses; behavioural tests; neurotoxicity

1. INTRODUCTION

Ayahuasca (or hoasca) is a psychoactive beverage traditionally used by diverse Amazonian indigenous populations in shamanic rituals (McKeena, 2004). It was introduced to non-indigenous Brazilians in the 1930s and to beyond the Amazon borders in the 1970s in the context of religious groups, including *Santo Daime* and *União do Vegetal* (UDV) (McRae, 2004). Religious use of ayahuasca has been regulated in Brazil since 1986 in response to society and health authority concerns over its inadequate use while granting the freedom of religious practices (CONAD, 2010). This freedom has also been granted in other countries, including the USA, Canada and the Netherlands (Labate and Feeney, 2012; Bouso *et al.*, 2012). However, the use of ayahuasca extends beyond religious practices and may be used for recreational purposes by people seeking only the psychedelic effects of the infusion.

The psychoactive properties of ayahuasca are due to the substances present in the plants normally used to prepare the infusion: N,N-dimethyltryptamine (DMT) present in the leaves of *Psychotria viridis*, and β -carboline alkaloids such as harmine, harmaline and tetrahydroharmine, present in the *Banisteriopsis caapi* vine (MacKee, 2004) (Fig. 1). DMT, a non-selective serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT; Fig. 1) receptor agonist, elicits its effect through stimulation of the 5-HT_{2A}serotonin receptor (Smith *et al.*, 1998), an action that may be attenuated by its interaction with 5-HT_{1A} receptors (Halberstadt and Geyer, 2011). However, unlike other hallucinogens, it is inactive when administered orally as it is readily metabolized by monoamine oxidases (MAO) (Suzuki *et al.*, 1981). β -carbolines, mainly harmine and harmaline, inhibit MAO activity (Wang *et al.*, 2010),and therefore block the metabolic breakdown of DMT in the liver and gut. Thus, DMT is absorbed in the gastrointestinaltract allowing the psychoactive properties of the ayahuasca infusion to occur (Ott, 1999; Riba *et al.*, 2003). Furthermore, as MAO inhibitors, β -carbolines can increase the level of serotonin in the brain (McKeena, 2004), and are capable of inducing direct psychoactive effects (Freedland and Mansbach, 1999; Brierley and Davidson, 2012). Brierley and Davidson (2013) also suggested that harmine augments dopamine efflux via a novel shell-specific, presynaptic 5-HT_{2A} receptor-dependent mechanism, independent of MAO inhibitory activity.

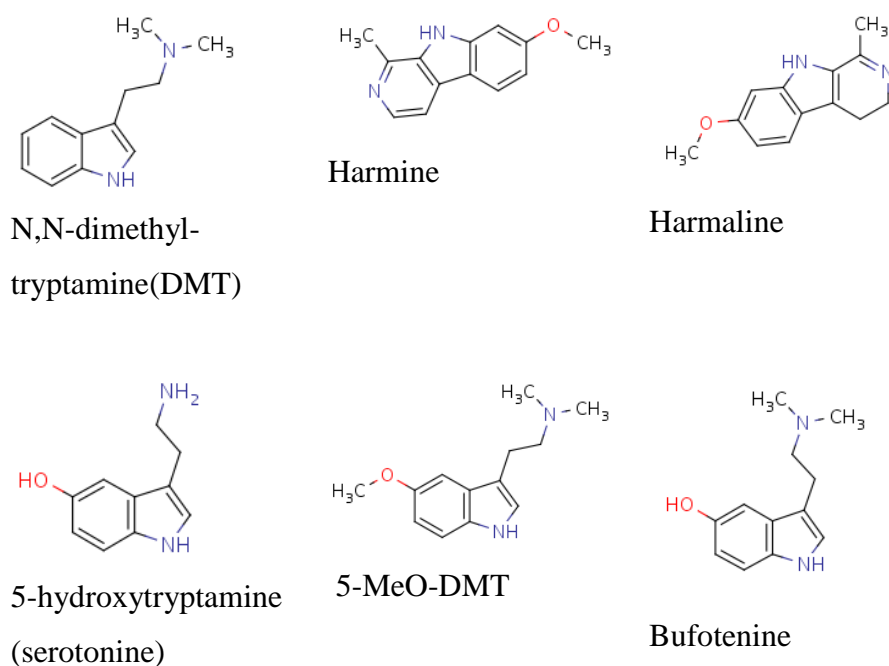


Figure. 1. Chemical structures of the main components of ayahuasca infusion (DMT, harmine and harmaline), serotonin, 5-MeO-DMT and bufotenine.

The effects and pharmacokinetics of ayahuasca in healthy volunteers after a single or two-repeated ritual doses (containing approximately 0.5 - 1 mg/kg body weight of DMT) are thoroughly described in the literature (Callway *et al.*, 1999; Riba *et al.*, 2003; Barbanøj *et al.*, 2008; Bouso *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2012; Riba *et al.*, 2012). The effects of ayahuasca ingestion include phosphene imagery seen with the eyes closed, dream-like reveries, alertness and stimulation, increased respiratory and cardiac rate, nausea, vomiting and tremor. Other studies have investigated the therapeutic properties of ayahuasca, primarily for drug addiction (Brierley and Davidson, 2012; Thomas *et al.*, 2013).

Although the ritualistic use of ayahuasca is considered to be safe, indiscriminate use in large doses may have serious mental and physical health consequences (Dos Santos, 2013). However, ayahuasca toxicological data remains scarce in the literature. This study aimed at investigating the toxicity of an ayahuasca infusion provided by a UDV centre in *Wistar* rats after acute exposure at high-dose levels. The parameters investigated were lethal dose, impact on behaviour and neurotoxic potential.

2. Material and methods

2.1 Animals

The study was conducted with 33 healthy nulliparous female *Wistar* rats aged between 9 and 12 weeks, with a mean weight of 276.4 g (sd = 9.0g). The animals were acquired from Granja RG (São Paulo, Brazil) and allowed to acclimatize for a 15-day period in the Faculty of Health Sciences of the University of Brasilia (UnB) animal house prior to study initiation. Subjects were kept individually in a polypropylene cage under controlled conditions: 12h/12h, light/dark; 22-25° C; 45-60% humidity, and received water and commercial feed Purina® *ad libitum*. Animals were fasted for 12 hours prior to gavage with free access to water, and food was re-introduced 4 hours after dosing. The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the UnB Institute of Biological Sciences (No. 107766/2010).

2.2 Ayahuasca infusion

The ayahuasca infusion was provided by the *União do Vegetal* (UDV) group based in the Federal District, Brazil. Plants were collected and the infusion prepared on April 2011. The mariri vine (*Banisteriopsis caapi*) was collected in *Águas Lindas de Goiás* (15° 46' 17"S; 48° 14' 56"W). Chacrona leaves and shrub (*Psychotria viridis*) were collected in *Sobradinho*, Federal District (15° 75' 23"S; 47° 72' 92"W). Specimens of mariri vine and chacrona leaves were deposited in the University of Brasilia (UnB) Herbarium under the reference numbers Azevedo EP 149880 BRAHMS and Trieto B 149879 BRAHMS, respectively. The ayahuasca infusion was kept at -20°C until lyophilisation (Liotop L101) to be used throughout the experiment. Dry matter corresponded to 16% (w/v) of the infusion. The doses selected for this study were based on the usual dose consumed during a UDV ritual, which corresponds to 150 mL for a 70 kg person (1X). The weighed lyophilized material was subsequently re-suspended in 3 mL filtered water prior to treatment and administered by oral gavage to the rats.

2.3 Chemical characterization of the ayahuasca infusion

Harmaline (99.2% purity) and harmine (98% purity) standards were obtained from Sigma Aldrich. N,N-dimethyltryptamine (DMT) was synthesized according to the procedure of Quet al (2011) and its identity and purity confirmed by GC-MS/MS(Trace GC Ultra

coupled with a TSQ Quantum XLS Triple Quadrupole; Thermo Scientific), ^1H and ^{13}C -NMR (Varian Mercury Plus spectrometer 7.05 T operating at 300 MHz for ^1H and at 75.46 MHz for ^{13}C) and LC-MS TOF (Agilent 1100 Series) for exact mass determination.

A 100 μL aliquot of the infusion was dissolved in 10 mL acetonitrile, 1 mL filtered in Millex LCR PTFE0, 45 μm membrane and 1 μL injected in the GC-MS/MS for quantification against standard curves of harmaline, harmine and DMT prepared in acetonitrile. For DMT (MW of 187.3), the quantification and confirmation ions were m/z of 77 and 58 (β -cleavage), respectively. The results were confirmed by LC/MS/MS (LC Shimadzu coupled to a triple quadrupole mass spectrometer 4000QTRAP, Applied Biosystem/MDS Sciex). The analysis showed that the ayahuasca infusion contained 1.56 mg/mL harmine, 0.122 mg/mL harmaline and 0.141 mg/mL DMT. A ritual dose of this infusion (150 mL) contained 234 mg harmine, 18.3 mg harmaline and 21.2 mg DMT.

2.4 Acute oral toxicity

The acute oral toxicity of the ayahuasca was determined based on the OECD Guide protocol 423/2001 (Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method), which is a stepwise procedure using 3 animals of a single sex per step/dose. Depending on the mortality and/or moribund status of the animals, the experiment is repeated at a lower dose (at least 2 moribund or dead animals), or higher dose (a maximum of one moribund or dead animal). Each dose was tested in duplicate to enable classification in a toxicological ranking. The test started at an empirical dose of 30 times (=30X) the usual ayahuasca ritual dose.

Animals were weighed prior to administration and at three-day intervals following administration. Daily observations were made for clinical effects, including posture, tremor, piloerection, vocalization and convulsion. On day 14, all animals were euthanized by CO_2 exposure and the liver, spleen, heart, brain, stomach and kidneys macroscopically analyzed and weighed. Organ fragments were fixed in 4% formalin for 24 h and embedded in paraffin; 5–6 μm sections were obtained using a microtome (Leica) and stained with haematoxylin and eosin (H&E). Alterations from the normal structure were investigated under a light microscope (Olympus BX41 with a SCANSCOPE). Although the OECD 423/2001 protocol does not require a control group, animals dosed with filtered water were included in the experiment in order to obtain information for the behaviour tests.

2.5 Behaviour tests

The female rats dosed within the acute oral toxicity study were evaluated for motor and sensory behavioural functions one hour after the ayahuasca administration using the open field, elevated plus maze and forced swimming tests.

The open field equipment consisted of a circular wooden arena, with the 34 cm wall and the floor painted white, with a 96 cm diameter, 18 squares and a central area. The floor of the arena was divided into central, middle and external areas (Hall, 1934). One hour after ayahuasca administration, the animals were placed in the central area and their behaviour observed for 5 minutes. The parameters scored were: locomotion (number of quadrants crossed), number of entries in the central square, number of rearing, grooming, defecation (number of faecal boli), and urination. The test was repeated every 24 hours for 14 days

Immediately after the open field test, the animal was placed in the central platform of the elevated plus-maze, facing a closed arm. The equipment used in this study consisted of a plus-shaped wooden apparatus painted black with two open and two closed arms (each 50 cm long), with an open roof, elevated 38 cm from the floor with a central platform (10 x 10 cm). The closed arms had 43 cm high walls. Animal behaviour was observed for 5 minutes for the following parameters: number of entries into open arms, number of entries into closed arms, time spent in open arms (including the central square), time spent in closed arms, number of rearing, grooming, defecation and urination.

Following the elevated plus maze test, each rodent was submitted to the forced swimming test in a transparent glass tank 50.5 cm tall by 39cm in diameter filled with water (approximately 25°C) to a depth of 35cm. The test was conducted according to the protocol described by Lucena *et al.* (2010), which is a modification of the original protocol for rats (Porsolt, 1978). Following a 2-minute adaptation period, animal behaviour was observed for 3 minutes for the following parameters: immobility time, swimming time, climbing and defecation.

2.6 Neurotoxicity assays

Two groups of 6 animals were used in this experiment: the control group was given filtered water and the test group treated with 30X the ritual dose (3 mL by oral gavage). After dosing, the animals were placed in an open field arena for a 2-hour period prior to euthanasia via intra-peritoneal thiopental overdose (240 mg/kg). Using a peristaltic pump (AVS Projects), a transcardial perfusion of 0.9% saline solution (at 8mL/min for 5 minutes),

followed by a 4% formalin solution perfusion (10mL/min for 15 minutes) were performed. The brain was removed, immersed in 4% formalin solution for 48 hours for fixation, and stored in 30% sucrose solution. Each brain was sliced (coronal 50µm thick) using a vibrating microtome (KD 400) and the slices kept in anti-freezing solution at 4°C for a minimum of 48hrs. Slices from the following regions were selected for investigation: dorsal raphe nuclei (dorsal: DRD and ventral parts: DRV), amygdaloid nucleus (basolateral posterior nucleus: BLP) and hippocampal formation (dentate gyrus, DG, and the *Cornu Ammonis* areas CA1, CA2, CA3). The regions were identified based on the Rat Brain Atlas (Paxinos and Watson, 2007).

For immunohistochemical analysis, three slices of each selected brain region from each animal were pre-treated with 40 mL H₂O₂: methanol (3%) solution (9:1), followed by two washes with 0.3% Triton X-100 in PBS solution. Non-specific binding was blocked by incubation of the brain slices at 4°C for 48 hours in a solution of 3% goat serum in PBS and the primary polyclonal rabbit anti-*c-fos* antibody (from Sigma-Aldrich) diluted 1:1000 with PBS solution. The slices were washed in PBS solution and incubated with goat anti-rabbit IgG-biotinylated secondary antibody (from Sinapse Biotecnologia) in a 1:100 dilution in PBS solution for 2 hours. Sections were treated with ABC reagent (Thermo Scientific) for 30 minutes. Immunoreactions were visualized by exposing the slices to a solution of 0.06% 3,3'-diaminobenzidine, containing 10µL of 30% H₂O₂ solution for 8-10 minutes. Finally, the slices were washed in PBS solution, placed on gelatinized slides, dehydrated in graded alcohol, cleaned in xylene and covered by entellan (Merck). The number of fos-positive neurons was counted using the Leica Application Suite (LAS 4.1.0). The full areas were counted in the dorsal raphe nuclei and hippocampal formations and selected areas were counted for BLP.

To evaluate neuron injury, three slices of each brain region were stained with Fluoro-jade B using the protocols described by Schmued & Hopkins (2000). The analysis of this staining was performed according to the following classification: (0) not marked; (+) weakly marked, (++) mildly marked; and (+++) strongly marked. Neuron death and loss evaluation was performed using Nissl/Cresyl violet staining. Three slices of each selected brain region from each animal were stained and analyzed.

2.7 Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism Software version 6.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA) or SPSS Statistics 17.0. Data are expressed as mean \pm standard error (SEM). For each behavioural category, the data obtained were subjected to one way ANOVA followed by the Tukey test. The immunohistochemical data was analyzed by the Student's t test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1 Acute toxicity

None of the three first animals treated with 30X the usual dose died or had any morbidity signs throughout the 14-day study. When this test was repeated, one animal died in the first 2 hours after oral gavage. Piloerection and tremors were observed during the first 24 hours in all dosed animals. In accordance with the OECD 423/2001 protocol, the experiment was repeated at a higher dose, which was the highest possible dose that could be given to the rat by gavage, 50X the usual dose. This limitation is due to the difficulty to dissolve the lyophilized material in water using a maximum of 3 mL dose volume. The same results were obtained in this dose group: one death among the 6 tested animals (5 hours and 40 minutes after gavage), piloerection and tremors within the first 24 hours. These results indicate that the lethal oral dose of the ayahuasca infusion to female *Wistar* rats is higher than 50X the usual dose, or higher than 15.1 mg/kg bw DMT, 13.1 mg/kg bw harmaline and 167 mg/kg bw harmine. Both animals that died showed flat body posture, reciprocal forepawtreading, hindlimb abduction, and lateral head weaving, characteristic symptoms of 5-HT behavioral syndrome (Halberstadt and Geyer, 2011)

Table 1 shows the food consumption and organ weights of the control and treated animals during 14 days after a single oral dose of ayahuasca. A significant decrease in food consumption was observed in the first 3 days after treatment in the 50X treated group compared to the lower dose and the control group, and an increase in food consumption was observed in both tested doses at the end of the experiment compared to the control. Rats from the control group consumed significantly less food between 10-14 days compared to 0–3 days, while the 50X group increased food consumption during the same period. All the

changes in food consumption did not impact animal body weights among the groups nor over the experimental period (data not shown).

All treated animal stomachs were dilated at the time of necropsy 14 days after treatment, with a significant increase in weight compared with the controls (Table 1). Analysis done with relative organ weights gave the same results (data not shown). No other macroscopic alterations were observed in the animal organs, and no histological alteration was observed at any dose level in liver, spleen, kidney and heart (data not shown).

Table 1

Food consumption and organ weight (g) of the control group and ayahuasca treated groups during (single dose). Data are the mean \pm standard error.

	Control (n=7)	30X (n=5)	50X (n=5)
<i>Food consumption, g</i>			
Day 0-3	62.5 \pm 1.5 ^{a†}	72.6 \pm 12.4 ^a	27.6 \pm 10.5 ^{b†}
Day 3-7	45.41 \pm 2.6 [‡]	59.6 \pm 10.7	65.6 \pm 8.6 [‡]
Day 7-10	65.2 \pm 3.5 [†]	58.9 \pm 4.3	66.4 \pm 11 [‡]
Day 10-14	37.4 \pm 2.6 ^{a‡}	49.5 \pm 1.3 ^b	51.7 \pm 5.3 ^{b‡}
<i>Organ weight, g</i>			
Liver	11.3 \pm 0.56	10.9 \pm 0.77	11.2 \pm 0.72
Spleen	0.94 \pm 0.05	0.80 \pm 0.03	0.78 \pm 0.07
Left kidney	0.91 \pm 0.08	1.0 \pm 0.05	1.1 \pm 0.06
Right kidney	0.99 \pm 0.04	1.1 \pm 0.05	1.1 \pm 0.07
Stomach	2.8 \pm 0.20 ^a	4.3 \pm 0.40 ^b	3.8 \pm 0.23 ^b
Heart	0.94 \pm 0.05	0.90 \pm 0.05	1.0 \pm 0.06
Brain	2.0 \pm 0.16	2.0 \pm 0.03	2.1 \pm 0.14

Letters: comparison among groups at the same day; symbols: comparison within the same group during the study period. Significant differences for mean with different letters or symbols (P<0.05).

3.2 Behaviour tests

In the open field test, there was a significant decrease in locomotion and rearing performed by animals from both treated groups compared with the controls (Fig. 2). Rats from the treated groups entered the central square less than the control, but this decrease was

only significant for the 30X group. Decreased locomotion was still observed 24 hrs after ayahuasca exposure for the 30X group, but this effect was not seen over the following days (data not shown). No statistical differences were found between treated groups and the control for number of faecal boli, grooming and urination (data not shown).

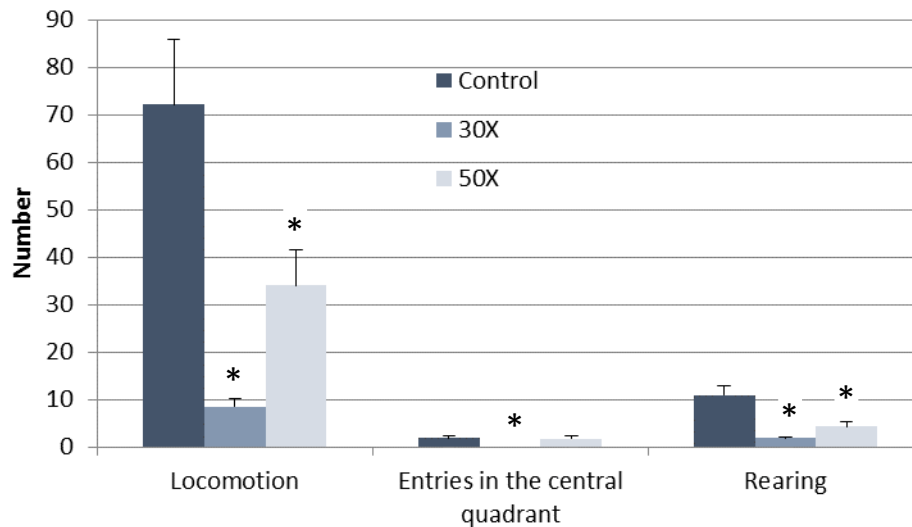


Figure 2. Results of the open field test. * significantly different from controls ($p < 0.05$). $N = 7$ for control group; $n = 6$ for treated groups.

Fig. 3 shows the results of the elevated plus maze test. Ayahuasca treated rats had statistically less entries in the open and closed arms than the controls, and rats from the 50X dose group spent more time in the open arms (which includes the centre of the platform) and less time in the closed arms than the controls (Fig. 3A). Treated rats had a significant decrease in the number of rearing and grooming than the controls. Those from the 50X group also showed less urination than the controls (Fig. 3B). Fig. 4 shows that the swimming time and number of climbing trials were significantly higher in the ayahuasca-treated animals, with a corresponding lower immobility time than that of the control groups.

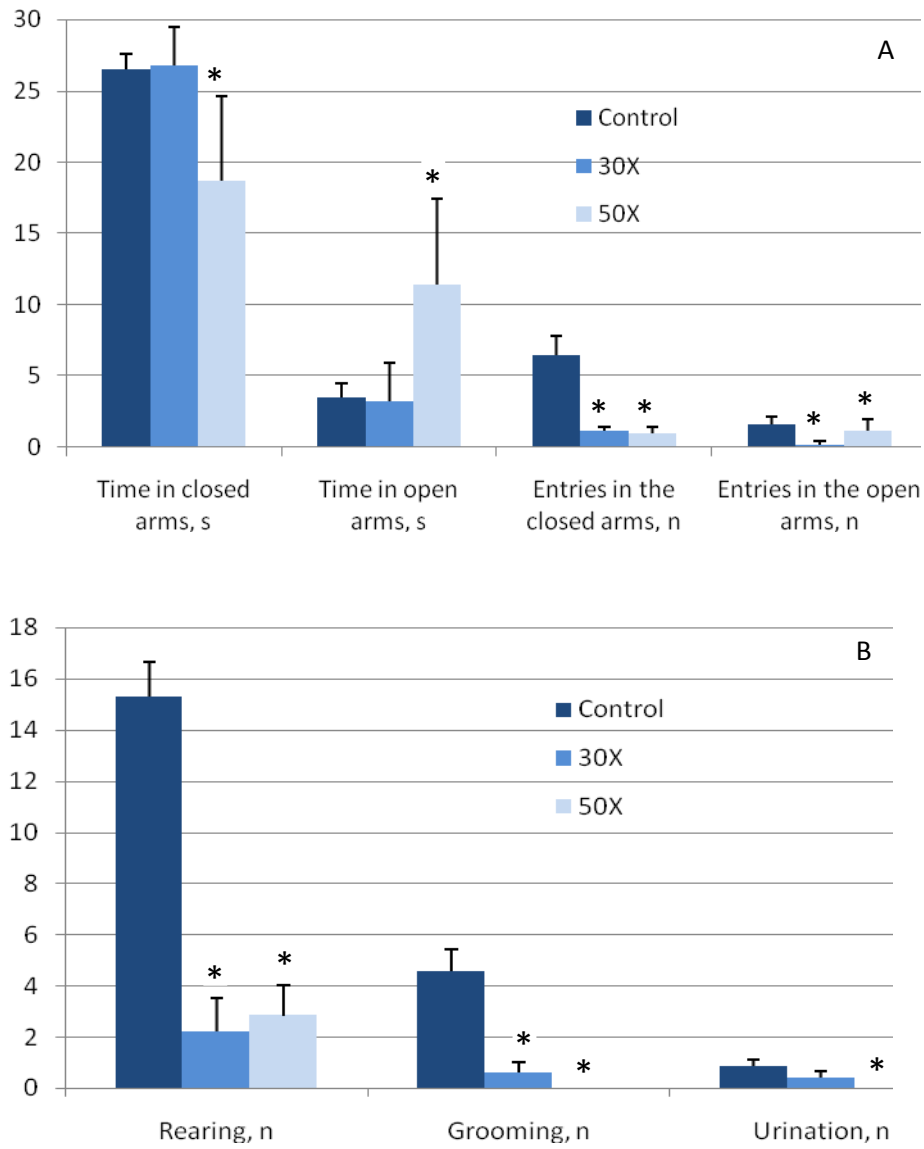


Figure 3. Results of the elevated plus-maze test (A and B). Time spent in closed and open arms are given in seconds (s) divided by 10; n = number of events; *significantly different from controls ($p < 0.05$). N= 7 for control group; n= 5 for 30X group and n=6 for 50X group.

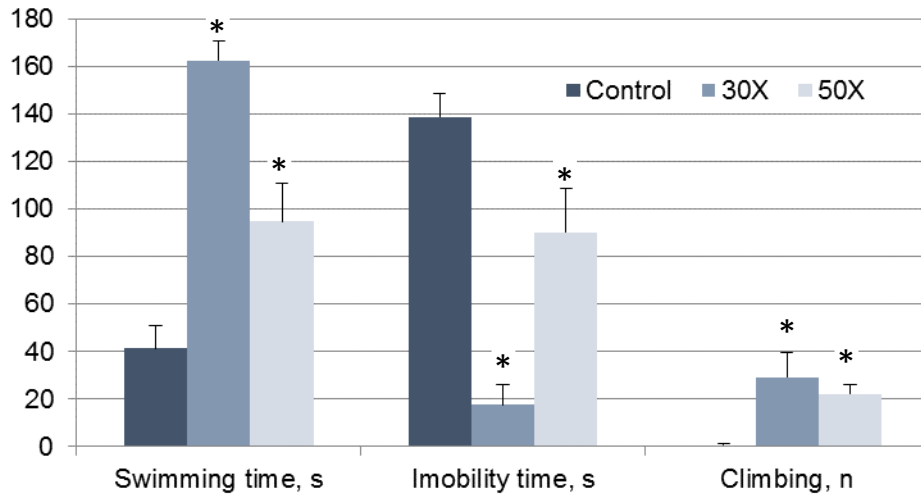


Figure 4. Results of the forced swimming test. Swimming and immobility time are given in seconds (s); n= number of events; * significantly different from controls ($p < 0.05$). N= 7 for control group; n= 5 for 30X group and n=6 for 50X group.

3.3 Neurotoxicity

Fig. 5A and 5B show the area selected for *c-fos* reactive neuron counting of the dorsal raphe nuclei of 30X treated and control animals, with strongly marked neurons considered positive (Fig. 5C). The same selection method was used to quantify *c-fos* reactive neurons in the other brain areas. A significant increase ($p < 0.05$) in marked neuron counting of the dorsal raphe nuclei was observed in comparison with the control (Fig. 5D). This increase was also identified in the basolateral posterior amygdaloid nucleus ($p < 0.001$, Fig. 6A) and in all hippocampal formation regions investigated (Fig. 6B).

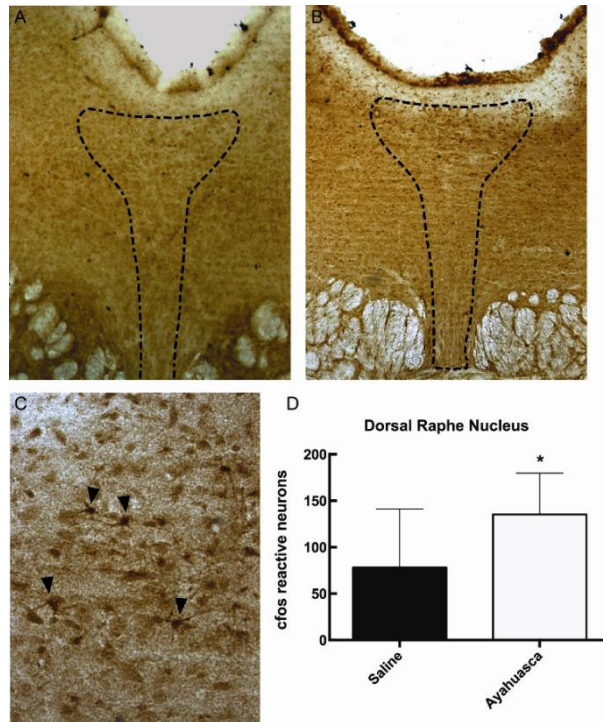


Figure. 5: *C-fos* reactive neurons from dorsal raphe nuclei (dorsal and ventral parts). A, B and C- Coronal sections from midbrain region. In A and B the traced region points is the dorsal raphe nuclei. A- raphe nuclei region from a rat that receives saline (at 10x) B-Dorsal raphe nuclei region from a rat that treated with Ayahuasca (at 10x). C- Dorsal portion of dorsal raphe nucleus showing the aspect of some *c-fos* reactive neurons (arrow heads). D- Statistical differences in number of *c-fos* reactive neurons between the two treatments: saline and Ayahuasca. *** $p < 0.001$. N=6.

In the Fluoro-Jade B analysis, the control rats did not show any evidence of marked neurons, whereas the treated rats showed marked neurons in all areas analysed. The DRN region was strongly marked (+++), probably as a consequence of the strong activation of the *c-fos* reactive neurons shown in Fig. 4D. Dentate gyrus and amygdaloid nucleus showed to be mildly marked (++) and the CA1 region of hippocampal formation was weakly marked (+). No marks were observed in the CA2 or CA3 neurons, probably because the experiment was conducted only 2 hours after exposure and changes in this region would be expected to be seen later. Control animals showed no marked neurons in any region investigated. Nissl substance staining did not show any significant difference in viable neurons and composition of hippocampal formation layers between control and treated animals.

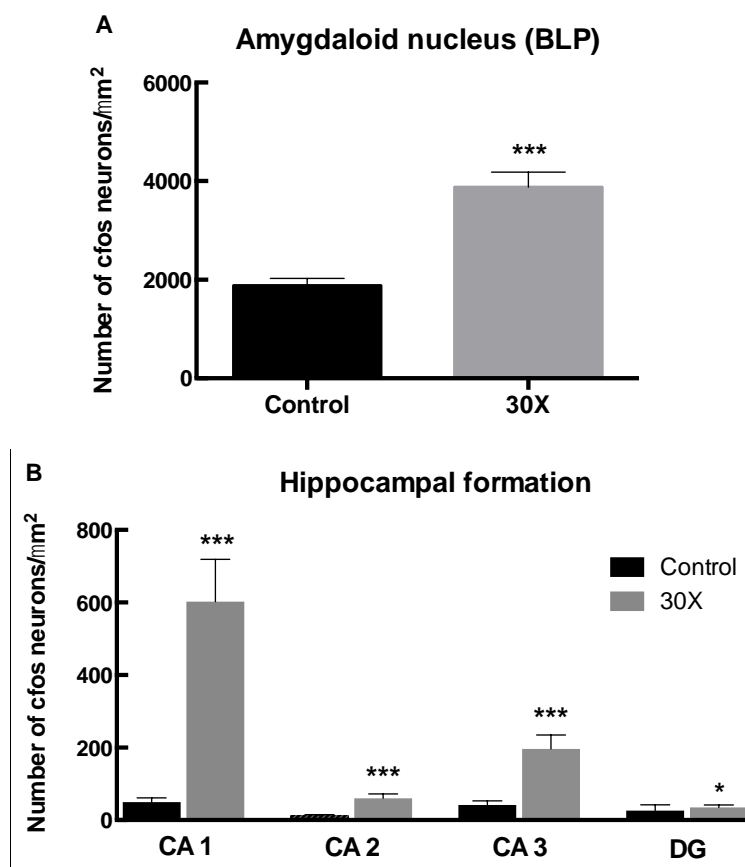


Figure 6. Number of *c-fos* reactive neurons from basolateral posterior amygdaloid nucleus (A) and hippocampal formation (B) *** $p < 0.001$ in relation to control. N=6.

4. Discussion

During the acute study, piloerection and tremors were observed during the first 24 hrs in all dosed animals, and those who died (one from each tested dose) also showed symptoms of serotonergic syndrome. A significant increase in food consumption was observed in both treated groups compared to controls. This probably led to the increased stomach weight observed in treated animals during the last three days of the experiment. The stomachs were also dilated, although no histological alterations were observed.

The acute oral toxicity test OECD 423/2001 is not intended to calculate a precise LD₅₀ of a substance, but rather to classify the substance according to toxicity classes defined by fixed LD₅₀ cut-off values. When lethality (2-3 rats) does not occur at 2000 mg/kg bw, the substance is classified as of relatively low acute toxicity hazard (LD₅₀>2000 mg/kg). Ayahuasca is a mixture of active substances, so the tested doses were related to the usual dose (in mg/kg bw) used by a 70 kg person in a UDV ritual. The highest dose tested (50X of

the usual dose) was limited by the water solubility of the lyophilized material (in 3 mL water). The results of the acute study showed that the lethal dose of the ayahuasca infusion in female *wistar* rats was greater than 50X of the usual dose. Based on the chemical analysis of the infusion, this dose corresponded to 15.1 mg/kg bw DMT, 13.1 mg/kg bw harmaline and 167 mg/kg bw harmine. To the best of our knowledge, oral LD₅₀ values for these substances have not been determined, but the subcutaneous LD₅₀ for harmaline and harmine in rats and the intravenous LD₅₀ of harmine in mice were reported as 120, 200 and 38 mg/kg bw, respectively (Mahmoudian *et al.*, 2002). Lima *et al.* (2006) estimated a LD₅₀ of ayahuasca (provided by UDV) in male Swiss albino mice that corresponded to 19 mg/kg bw DMT. Although this result corroborates ours, it should be considered with caution as only a qualitative analysis was performed to confirm the presence of the alkaloids in the infusion. No information regarding the amount administered to the animals was included in the study.

The ayahuasca alkaloid profile varies considerably, mainly due to the proportion of the plants and the method used to prepare the infusion, as well as the plant cultivars (McKeena *et al.*, 1984; McKeena, 2004). The level of harmine present in the material used in this study (1.56 mg/mL) was similar to that reported by Callaway *et al.* (1999; 1.7 mg/mL) in a human pharmacokinetic study, and by Oliveira *et al.* (2010; 1.37 mg/mL) in toxicological studies. However, our infusion contained less DMT (0.141 mg/mL) than the material used by the other authors (0.23-0.42 mg/mL).

Extrapolation of results from animal studies to humans is the basis of the risk assessment process and has been used for establishing safe exposure levels of humans to chemicals (IPCS, 2009). In general, a safety factor of 10 is applied to account for interspecies variability, assuming humans to be more sensitive. If we apply a safety factor of 10 to the acute dose of ayahuasca found in the rat (>50X), the safety margin in humans would be over 5 times the usual dose, corresponding to 1.5 mg/kg bw DMT (or, over 750 mL of the UDV infusion by a 70 kg bw person). It is highly probable that the actual safety margin in humans is much higher. Volunteers exposed to ayahuasca at doses corresponding to 1 mg/kg bw DMT in clinical studies showed no sign of toxicity (Riba *et al.*, 2012). Gable (2007) estimated a safety margin of 20 times the usual dose based on the intravenous LD₅₀ of 32 mg/kg bw for DMT in mice, an intravenous-to-oral conversion factor of 1:5, a safety factor of 20, and 27 mg DMT per ayahuasca dose.

Serotonin syndrome was observed in rats in this study and may actually happen during ayahuasca consumption by humans, especially if pro-serotonergic drugs are

concomitantly ingested (Callaway and Grob, 1998). Sklerov *et al* (2005) reported a fatal case involving the recreational use of an ayahuasca-like preparation followed by the ingestion of 5-MeO-DMT (Fig. 1), an indoleamine present in *Virola* sp and other plants (Ott, 2001). Although amines were found in the gastric content (3.3 mg/L DMT, 122 mg/L harmine, 6.4 mg/L harmaline, 202 mg/L 5-MeO-DMT), hallucinogenic amine intoxication was ruled out as the cause of death, which could not be determined. The media have reported fatalities involving the consumption of ayahuasca in Brazil and other South American countries in the last decade. However, no direct implication with the infusion could be made due to lack of forensic analysis, information regarding the actual dose taken and previous health conditions of the individual (Dos Santos; 2013b).

The behavioural effects of the ayahuasca infusion after acute exposure were assessed in this study using the open field, elevated plus-maze and forced swimming tests. The open field test is a common measure of exploratory behaviour and general activity in rodents. It was originally used to investigate the emotionality of rats (fear), indicated through increased defecation and urination (Hall, 1934). In this study, no significant differences were found in these parameters between control and treated animals. The open field model is based on rodent aversion to open space and a tendency to walk close to the walls, a behaviour known as thigmotaxis (Lamprea *et al.*, 2008), allowing the assessment of the potential stimulant, depressant or anxiolytic effects of a given compound (Prut and Belzung, 2003). Parenteral administration of 5HT_{1A} agonists generally induces anxiolytic-like effects in rats subject to the open field tests, although non-specific 5-HT agonists (such as DMT) were anxiogenic or had no effect in most studies (Prut and Belzung, 2003). Indeed, no anxiolytic or anxiogenic effect were observed in ayahuasca-treated rats at doses corresponding to 9.1 and 15.1 mg/kg bw DMT in this study. However, clearly decreased locomotion activity was seen at both dose levels. In addition, treated animals explored the open field significantly less than control animals, which is shown by the significant decrease in rearing.

The elevated plus-maze is based on spontaneous exploratory behaviour of rodents, and their natural aversion for the open arms caused by fear and anxiety (Pellow *et al.*, 1985; Walf and Frye, 2007). Thus, an increase in the number of entries added to the lengthy time spent in the apparatus open arms indicates a lower level of anxiety (Pellow *et al.* 1985, Hogg 1996). Animals treated with ayahuasca entered open arms significantly less than the controls, but also entered less the closed arms, meaning that they move less through the apparatus. This confirms the open field test results that showed a decreased mobility effect

of the ayahuasca at the doses tested. Furthermore, as in the open field, the treated animals showed significantly less rearing than the control group, reflecting less intention to explore. Lima *et al.* (2006) observed similar effects in rodents treated with ayahuasca at a dose corresponding to 2.5 mg/kg bw DMT, lower than the DMT doses used in this study.

Serotonergic hallucinogens produce significant effects on mobility and exploratory behaviours in rodents. In mice, moderate doses of phenyl alkylamines (such as mescaline and 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine) were shown to increase locomotion activity that are mediated by the 5-HT_{2A} receptor, but indoleamines, such as psilocin and 5-MeO-DMT, decrease locomotor activity that are mediated by the 5-HT₁ receptor (Halberstadt *et al.*, 2009; Halberstadt and Geyer, 2011). Rats exposed to 5-MeO-DMT (a longer acting indoleamine than DMT) at 0.1 mg/kg bw combined with a MAO inhibitor showed decreased locomotor activity in the behavioural pattern monitor (Halberstadt *et al.*, 2008). However, at a 1 mg/kg bw dose, decreasing locomotion was followed by an increasing activity phase. The authors hypothesized that this biphasic behaviour is due to bufotenine (5-OH-DMT; Fig. 1), formed by O-methylation of 5-MeO-DMT by cytochrome P-450 2D6, and ten-fold more potent 5-HT_{2A} agonist than its precursor. Bufotenine is likely to be formed by a cytochrome P-450 (CYP) in rats exposed to ayahuasca (Parkinson, 2001) and has been detected in human urine in clinical studies (McIlhenny *et al.*, 2011). A higher DMT dose was used in our study (up to 15.1 mg/kg bw) and the behavior tests were only conducted once within the first 24 hours. However, when the open field test was repeated one day later, treated animals still showed significantly decreased locomotor activity compared with controls. From day 2 onwards, no significant differences were observed in this parameter in treated and control animals, indicating phasing out of the ayahuasca effects.

The forced swimming test (also known as behavioural despair or Porsolt test) is one of the most used tools for screening antidepressants in rodent models (Porsolt *et al.*, 1978). Healthy rodents, even when unable to escape from the water-filled cylinders, will try to swim out of the containers. Depressed rodents will stop trying and float in the cylinders, suggesting a feeling of despair (Porsolt *et al.*, 1977). The antidepressant effect of MAO inhibitors in this model was first described by Loomer *et al.* (1957). In our study, animals treated with ayahuasca continue to swim for a significantly longer time than the controls, suggesting a will to escape from the stressful environment. This result is emphasised by a significant increase in the number of climbing on the aquarium walls. These results strongly suggest that the ayahuasca infusion has an antidepressant effect. Lima *et al.*, (2006) found

similar results in their ayahuasca study. Harmine, the most concentrated β -carboline found in ayahuasca, was shown to have an antidepressant-like effect in rodents after chronic and acute oral exposure using forced swimming tests (decreased immobility time, increased swimming and climbing) (Fortunato *et al.*, 2009, 2010). Santos *et al.* (2007) showed that regular ayahuasca users scored lower on the scales for the related panic and hopelessness states.

The raphe nuclei are a cluster of nuclei found in the brain stem whose main function is to release serotonin to the rest of the brain. The dorsal raphe nucleus (DRN) plays an important role in the facilitation of anxiety-related physiological or behavioural responses to drugs or uncontrollable aversive stimuli, and has efferent projections to the amygdala, hippocampus and locus coeruleus (Peyron *et al.*, 1998; Lowry *et al.*, 2008). In this study, neuronal activation resulting from acute ayahuasca exposure was assessed by measuring the expression of proto-oncogene *c-fos* in the DRN, amygdaloid complex and different areas of the hippocampal formation 2h after oral administration of ayahuasca at the 30X dose. The transient induction of *c-fos* can be detected within neurons by immunohistochemical techniques, disappearing 4-16 hours later (Mugnaini, *et al.* 1989; Bullitt, 1990). Marked neurons were significantly increased in all treated animal brain areas investigated in comparison with the controls, confirming that ayahuasca influences neural systems involved in interoception and emotional processing that are modulated by serotonergic pathways. This confirms results from neuroimaging studies conducted with regular ayahuasca users that show activation of brain structures involved in emotional arousal (amygdala/parahippocampalgyrus) (Riba *et al.*, 2006).

The Nissl staining experiment did not indicate any major brain lesions in the 30X treated animals that could lead to alterations in the morphology and number of cells of the regions investigated in this study. However, fluoro-Jade B neuron staining of the brain areas analyzed, demonstrated brain injury in the treated animals, especially in the DRN. Figueroa (2012) showed neuron apoptosis in the 5X dose exposed rats through the TUNEL test (Terminal deoxy nucleotidyl transferase UTP nick end labeling), which could support the hypothesis that apoptosis occurs after neuron injury as detected in our study.

One of the limitations of this study was the inability to expose the rats to higher than 50X the usual dose due to the limited water solubility of the lyophilized material. As a consequence, a more realistic safety margin to humans could not be determined. Although neuron injury was observed, we did not investigate if this injury leads to apoptosis, which

could be done by the use of antibodies against caspases 3 and 9 (Lavrik *et al.*, 2005). Ritualistic use of ayahuasca at UDV generally occurs once every 2 weeks, and a single dose exposure is the best model to study the toxicological potential of the infusion. However, it will be essential to repeat the behavioral and neurotoxicity tests at doses lower than those used in this study, closer to the usual human dose, and to determine the no adverse effect level (NOAEL) of the ayahuasca infusion.

5. Conclusion

This study showed that the lethal acute dose of the ayahuasca infusion on Wistar female rat was over 50 times the usual dose taken in a UDV ritual, corresponding to over 15.1 mg/kg bw DMT. Behavioural tests showed that the high doses of ayahuasca tested decreased locomotor and exploratory activities and had antidepressant effects in the rats, therefore indicating its influence in the neural systems involved with interoception and emotional processing, which are modulated by serotonergic pathways. Indeed, *c-fos* expression activation was found in brain areas involved with serotonergic neurotransmission, and showed to be a model that can aid in the identification of ayahuasca neuroeffects. At the high level tested (30X), this activation led to neuronal injury, probably through the apoptotic pathway.

Many studies have shown that the use of ayahuasca in a religious context used by UDV and other religious groups in Brazil has a large safety margin. However, the results of this study suggest that caution should be taken when this infusion is used at much higher doses for recreational purposes, especially if the user is simultaneously exposed to other psychoactive substances, including illegal or prescribed drugs.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Federal District Research Foundation (FAP-DF; Grant 193000358/2010). Luciana Gueiros da Motta was supported with a Master's scholarship from the REUNI Program of the University of Brasilia.

References

- Barbanoj, M.J., Riba, J., Clos, S., Giménez, S., Grasa, E., Romero, S., 2008. Daytime Ayahuasca administration modulates REM and slow-wave sleep in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 196: 315-326.
- Bouso, J.C., González, D., Fondevila, S., Cutchet, M., Fernández, X., Ribeiro B., P.C, Alcázar-Córcoles, M.Á., Araújo, W.S., Barbanoj, M.J., Fábregas, J.M., Riba, J., 2012. Personality, psychopathology, life attitudes and neuropsychological performance among ritual users of ayahuasca: a longitudinal study. *PLoS One* 7, 42421: 1-13.
- Brierley, D.I., Davidson, C., 2012. Developments in harmine pharmacology-implications for ayahuasca use and drug-dependence treatment. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry* 39: 263-272.
- Brierley, D.I., Davidson, C., 2013. Harmine augments electrically evoked dopamine efflux in the nucleus accumbens shell. *Journal of Psychopharmacology* 27: 98-108.
- Bullitt, E., 1990. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 296: 517-530.
- Callaway, J.C., Grob, C.S., 1998. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: a potencial combination for severe adverse interactions. *Journal Psychoactive Drugs* 30: 367-369.
- Callaway, J.C., McKenna, D.J., Grob, C.S., Brito, G.S., Raymon, L.P., Poland, R.E., Andrade, E.N., Andrade, E.O., Mash, D.C., 1999. Pharmacokinetics of hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethopharmacology* 65: 243-256.
- CONAD. *Conselho Nacional de Políticas sobre Drogas*, 2010. Available at ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpseesp/bibliote/informe_eletronico/2010/iels.jan.10/iels16/URS-CONAD-1_250110.pdf.
- Dos Santos, R.G., Grasa, E., Valle, M., Ballester, M.R., Bouso, J.C., Nomdeléu, J.F., Homs, R., Barbanoj, M.J., Riba, J., 2012. pharmacology of ayahuasca administered in two repeated doses. *Psychopharmacology* 219: 1039-53.
- Dos Santos R.G., 2013. A Critical evaluation of reports associating ayahuasca with life-threatening adverse reactions. *Journal Psychoactive Drugs*, 45: 179–188.
- Figuroa, A.R.M, 2012. Evaluation of the neurotoxic effects of ayahuasca tea, 118f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto da Universidade de São Paulo, Riberão Preto. Brasil.

- Freedland, C.S., Mansbach, R.S., 1999. Behavioral profile of constituents in ayahuasca, an Amazonian psychoactive plant mixture. *Drug Alcohol Dependence* 54: 183-94.
- Fortunato, J.J., Réus, G.Z., Kirsch, T.R., Stringari, R.B., Stertz, L., Kapczinski, F., Pinto, J.P., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Quevedo, J., 2009. Acute harmine administration induces antidepressive-like effects and increases BDNF levels in the rat hippocampus. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33: 1425-30.
- Fortunato, J.J., Réus, G.Z., Kirsch, T.R., Stringari, R.B., Fries, G.R., Kapczinski, F., Hallak, J.E., Zuardi, A.W., Crippa, J.A., Quevedo, J., 2010. Chronic administration of harmine elicits antidepressant-like effects and increases BDNF levels in rat hippocampus. *Journal of Neural Transmission* 117: 1131-1137.
- Gable, R.S., 2007. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction* 102: 24-34.
- Halberstadt, A.L., Buell, M.R., Masten, V.L., Risbrough, V.B., Geyer, M.A., 2008. Modification of the effects of 5-methoxy-N,N-dimethyltryptamine on exploratory behavior in rats by monoamine oxidase inhibitors. *Psychopharmacology* 201: 55-66.
- Halberstadt, A.L., Van der Heijden, I., Ruderman, M.A., Risbrough, V.B., Gingrich, J.A., Geyer, M.A., Powell, S.B., 2009. 5-HT (2A) and 5-HT (2C) receptors exert opposing effects on locomotor activity in mice. *Neuropsychopharmacology* 34: 1958-1967.
- Halberstadt, A.L., Geyer, M.A., 2011. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology* 61: 364-381.
- Hall, C. S., 1934. Emotional behavior in the rat: Defecation and urination measures of individual differences in emotionality. *Journal Comparative Psychology* 18: 385-403.
- Hogg, S., 1996. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry Behavior* 54: 21-30.
- I.P.C.S., 2009. International Program on Chemical Safety. Principles and Methods for the Risk Assessment of Chemicals in Food. Chapter 5. Dose-response assessment and derivation of health-based guidance values. *Environmental Health Criteria* 240. Available from http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_240_8_eng_Chapter5.pdf.
- Labate, B., Feeney, K., 2012. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: implications and challenges. *International Journal of Drug Policy* 23: 154-161.

- Lamprea, M.R., Cardenas, F.P., Setem, J., Morato, S., 2008. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41: 135-140.
- Lavrik, I.N., Golks, A., Krammer, P.H., 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *Journal of Clinical Investigation* 115: 2665-2672.
- Lima, L.M., Ferreira, M.S., Ávila, A.A., Perazzo, F.F., Schneedorf, J.M., Carvalho, J. C.T., 2006. Ayahuasca central nervous system effects: Behavioral study. *Arztezeitschrift fur Naturheilverfahren* 47: 476-480.
- Loomer, H.P., Saunders, J.C., Kline, N.S., 1957. A clinic and pharmacodynamic evaluation of iproniazid as a psychic energizer. *Psychiatry Research Reports* 8: 129–141.
- Lowry, C.A., Hale, M.W., Evans, A.K., Heerkens, J., Staub, D.R., Gasser, P.J., Shekhar, A., 2008. Serotonergic systems, anxiety, and affective disorder: focus on the dorsomedial part of the dorsal raphe nucleus. *Annals of the New York Academy Sciences* 1148: 86-94.
- Lucena, G. M., Porto, F.A., Campos, E.G., Azevedo, M.S., Cechinel-Filho, V., Prediger, R., RUI D., Ferreira, V.M., 2010. *Cipura paludosa* attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development. *Ecology and Environmental* 73: 1150-1158.
- MacRae, E., 2004. The ritual use of ayahuasca by three Brazilian religions. *In* R. Coomber & N. South (Eds.), *Drug use and cultural contexts 'beyond the West': Tradition, change and post-colonialism* (pp. 27–45). UK: Free Association Books.
- McKenna, D.J., Towers, G.H.N., Abbott, F., 1984. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: triptamine and β -carboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology* 10: 195-223.
- McKenna, D.J., 2004. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacology Therapeutics* 102: 111 – 129.
- McIlhenny, E.H., Riba, J., Barbano, M.J., Strassman, R., Barker, S.A., 2011. Methodology for and the determination of the major constituents and metabolites of the Amazonian botanical medicine ayahuasca in human urine. *Biomedical Chromatography* 25: 970-984.
- Mahmoudian, M., Hossein J. H., Salehian, P., 2002. Toxicity of *peganumharmala*: review and a case report. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics* 1: 1-4.

- Mugnaini, E., Berrebi, A.S., Morgan, J.I., Curran, T., 1989. Fos-like immunoreactivity induced by seizure in mice is specifically associated with *c-fos* in neurons. *European Journal of Neuroscience* 1: 46-52.
- Oliveira, C.D., Moreira, C.Q., De Sá, L.R., Spinosa, H.S., Yonamine, M., 2010. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in *wistar* rats. *Birth Defects Research: Part B, Developmental and Reproductive Toxicology* 89: 207-212.
- Ott, J., 1999. Ayahuasca: human pharmacology of oral DMT plus harmine. *Journal Psychoactive Drugs* 31: 171-177.
- Ott, J., 2001. Ayahuasca-Pharmacology: Human intranasal, sublingual and oral pharmacology of 5-methoxy-N,N-dimethyl-tryptamine. *Journal Psychoactive Drugs* 33: 403-407.
- Parkinson, A. Biotransformation of xenobiotics. *In* Cassarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. Curtis D. Klaassen Editor. (pp. 133-224). McGraw-Hill. 2001.
- Paxino, G., Watson, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th Edition. Elsevier, Inc. 2007.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open closed arms entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 14: 149-67.
- Peyron, C., Petit, J.M., Rampon, C., Jouvet, M., Luppi, P.H., 1998. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443-68.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviours: a review. *European Journal of Pharmacology* 463: 3-33.
- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments, *European Journal of Pharmacology* 47: 379-391.
- Qu, S-J., Wang, G.F., Duan, W.H., Yao S.Y., Zuo J.P., Tan C.H., Zhu D.Y., 2011. Tryptamine derivatives as novel non-nucleosidic inhibitors against hepatitis B virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19: 3120-3127.
- Riba, J., Valle, M., Urbano, G., Yritia, M., Morte, A., Barbanoj, M.J., 2003. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion and pharmacokinetics. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 306: 73-83.

- Riba, J., Romero, S., Grasa, E., Mena, E., Carrió, I., Barbanoj, M.J., 2006. Increased frontal and paralimbic activation following ayahuasca, the pan-Amazonian inebriant. *Psychopharmacology* 186: 93-98.
- Riba, J., McIlhenny, E.H., Valle, M., Bouso, J.C., Barker, S.A., 2012. Metabolism and disposition of N,N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids after or administration of ayahuasca. *Drug Test and Analysis* 4: 610-616.
- Santos, R.G., Landeira-Fernandez, J., Strassman, R.J., Motta, V., Cruz, A.P., 2007. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in Santo Daime members. *Journal of Ethnopharmacology* 112: 507-513.
- Schmued, L.C., Hopkins, K.J., 2000. Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Research* 874: 123-130.
- Smith, R.L., Canton, H., Barrett, R.J., Sanders-Bush, E., 1998. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 61: 323-330.
- Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M., 1981. Characterization of eight biogenic indoleamines as substrates for type A and type B monoamine oxidase. *Biochemical Pharmacology* 30: 1353-1358.
- Thomas, G., Lucas, P., Capler, N.R., Tupper, K.W., Martin, G., 2013. Ayahuasca-assisted therapy for addiction: Results from a preliminary observational study in Canada. *Current Drug Abuse Reviews* 6: 30-42.
- UN. Convention on psychotropic Substances. United Nation, 1971. Available at http://www.unodc.org/pdf/convention_1971_en.pdf
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nature Protocols* 2: 322-328.
- Wang, Y.H., Samoylenko, V., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Miller, L.S., Chaurasiya, N.D., Rahman, M.M., Tripathi, L.M., Khan, S.I., Joshi, V.C., Wigger, F.T., Muhammad, I., 2010. Composition, standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi*, a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to Parkinson's disease. *Journal of Ethnopharmacology* 128: 662-671.

CAPÍTULO II

TOXICIDADE REPRODUTIVA DO CHÁ DE AYAHUASCA EM RATAS WISTAR

1. Introdução

A Resolução nº 5/2004 do Conselho Nacional de Políticas Sobre Drogas (CONAD) reconheceu o direito ao uso do chá em contextos religiosos, inclusive por menores de idade e grávidas, decisão reiterada pela Resolução nº 1/2010. Segundo a resolução, o uso da ayahuasca por menores de 18 (dezoito) anos deve permanecer como objeto de deliberação dos pais ou responsáveis, e cabem as grávidas a responsabilidade do uso, atendendo, permanentemente, a preservação do desenvolvimento e da estruturação da personalidade do menor e do nascituro. Seguidoras das religiões que utilizam a ayahuasca ingerem a bebida durante a gravidez como protetor e facilitador do parto (McKenna *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2005).

Num estudo recente conduzidos com ratos, Oliveira *et al.* (2010) concluíram que existe um risco de toxicidade materna e de desenvolvimento fetal devido a exposição à ayahuasca e que este efeito parece ser dose dependente. Santos (2010), recentemente questionou as conclusões dos autores, argumentando que as altas doses usadas do estudo não refletem uma exposição humana real, indicando a necessidade de estudos adicionais para esclarecer estes riscos.

Diante do exposto, esse estudo foi realizado visando esclarecer e ampliar o conhecimento científico a respeito do chá de ayahuasca. O objetivo principal foi avaliar a toxicidade materna e a embriofetotoxicidade de ratas *Wistar* expostas diariamente ao chá de ayahuasca do 6º ao 20º dia de gestação e avaliar a segurança das usuárias gestantes e de seus filhos no contexto religioso.

2. Protocolo experimental

Este estudo foi conduzido segundo o *Guideline for the Testing of Chemicals/ Prenatal Developmental Toxicity Study - 414* (OECD, 2001). O acasalamento das ratas se deu a partir da transferência de três fêmeas para a gaiola de cada macho durante as três últimas horas do período escuro (6 às 9 da manhã). Imediatamente após a separação dos animais, a ocorrência de cruzamento foi confirmada pela presença de “*plug*” (massa

esbranquiçada de espermatozóide na abertura vaginal), acrescido da observação em microscópico de luz de espermatozoides e células corneificadas do ciclo estral na lâmina do esfregaço vaginal. As primeiras 24 horas após essa confirmação foi considerado dia 0 (zero) de prenhez.

Após a confirmação do cruzamento as ratas foram alojadas em gaiolas individuais e encaminhadas aleatoriamente a cada um dos grupos experimentais do estudo, cada um com 25 animais. As doses de tratamento foram definidas a partir da dose utilizada pelos integrantes da UDV (uma dose X corresponde a 150 mL de chá para um indivíduo de aproximadamente 70 kg).

Grupo	Dose
Grupo I	Controle
Grupo II	1X
Grupo III	2X
Grupo IV	4X
Grupo V	8X

O chá de ayahuasca foi administrado oralmente, por gavagem, uma vez ao dia, do 6º dia (implantação) ao 20º dia de prenhes, sempre no período da manhã. Para o grupo controle foi administrado água filtrada nesses mesmos 15 dias de tratamento.

Durante todo o tratamento, as fêmeas foram examinadas diariamente quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade materna, qualquer variação foi devidamente registrada e o animal rigorosamente acompanhado. O peso corporal e o consumo de ração foram registrados a cada três dias, quando a dose foi ajustada ao peso corpóreo.

No 21º dia de gestação, de manhã, as fêmeas foram eutanasiadas por exposição ao CO₂ e, em seguida foi realizada a cesariana. O útero foi exposto e pesado com todo o seu conteúdo. Os órgãos (fígado, baço, rins, estômago, coração e cérebro) foram analisados macroscopicamente quanto ao aspecto, coloração e tamanho, pesados e fixados para posteriores análises histológicas. Os resultados das análises histológicas não serão apresentados nesta dissertação.

O número de fetos vivos, mortos e reabsorções foram registrados. O sexo dos fetos foi determinado pela distância ano-genital e contabilizados. Os ovários foram removidos e contados os corpos lúteos. O número de sítios de implantação foram determinados pelo

método de Salewski (1964), que consiste na imersão do útero sem fetos em solução de sulfeto de amônio a 10% por 10 minutos e após em solução de formada de partes iguais de ferrocianeto de potássio a 20% e ácido clorídrico a 1%, também por 10 minutos. Os sítios de implantação aparecem como pontos escuros na parede uterina.

Todos os fetos vivos foram medidos, pesados assim como suas placentas e examinados quanto à presença de anomalias externamente visíveis. Após eutanásia por exposição ao CO₂, 1/3 de cada ninhada, escolhidos aleatoriamente, foi fixada em solução de *Bodian* (5% ácido acético glacial, 2% formaldeído 37%, 72% de etanol e 21% de água destilada) e destinado à análise de anomalias viscerais pela técnica de microdissecação adaptada de Sterz (1997). Os 2/3 restantes de fetos de cada ninhada foram fixados em solução de acetona e posteriormente corados com solução de hidróxido de potássio e *Alizarina Red S* para futuras análises de malformações esqueléticas (Dawson, 1926).

Anomalias e/ou malformações viscerais

As anomalias viscerais foram avaliadas segundo Miranda *et al.* (2006), uma técnica de microdissecação adaptada de Sterz (1997). Este trabalho foi conduzido nas dependências do laboratório de Toxicologia Ambiental da Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, sob a supervisão do Dr. Francisco Paumgarten e da Dr^a. Rosangela Carvalho.

O procedimento de análise visceral segue o seguinte padrão: cada feto é retirado do fixador *Bodian*, cuidadosamente seco e pesado. Em seguida o feto é colocado em decúbito dorsal preso pelas patas com o auxílio de agulhas em uma placa de borracha. Com um bisturi, o abdômen é aberto por uma incisão transversal acompanhando o arco das costelas e longitudinalmente dos lados direito e esquerdo até o ânus formando um triângulo. Com uma pinça é retirada a parede abdominal e os testículos ou ovários são localizados e retirados para confirmação do sexo. Todos os órgãos abdominais são retirados e avaliados em relação ao tamanho, formato e posicionamento. Fígado, pulmão, rins, coração, timo, e baço são pesados, e os lóbulos do fígado e pulmão são contados. Avalia-se o calibre e tamanho dos ureteres e depois os rins são cortados longitudinalmente para o exame interior. O diafragma é analisado para verificação de perfurações. O exame do coração é cauteloso, o pericárdio e as aurículas são retirados para melhor visualização, e o coração sofre um corte longitudinal para visualização de todas as suas cavidades internas. É feito um corte transversal na boca para visualização do palato. A cabeça é separada e seccionada para exame do cérebro. Todos esses procedimentos foram realizados sob estereomicroscópio (*Sv11 Stemi Zeiss*).

Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada pela análise da variância de uma via (ANOVA) ou, alternativamente, pelo teste *Kruskal-Wallis* quando os dados não se ajustavam à curva normal. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *Tukey*, quando não-pareados e no caso dos dados não-paramétricos, pelo teste *U Mann-Whitney*. Em todos os casos foi considerada diferença estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$. Os cálculos estatísticos foram realizados utilizando o programa *SPSS statistics 19*.

3. Resultados

Toxicidade Materna

Todas as fêmeas foram examinadas diariamente e sinais clínicos como morbidade/mortalidade, piloereção, cromodacriorréia, alterações de locomoção, diarreia e hemorragia vaginal foram anotados. Peso corporal e consumo de ração (verificados a cada três dias), peso e análise macroscópica dos órgãos (fígado, rins, cérebro, estômago, coração e baço), foram registrados após necropsia, como preconizado no Protocolo OECD 414/2001.

A Tabela 1 mostra os sinais clínicos e alterações macroscópicas relevantes observadas nas fêmeas durante o período do estudo. Pelo menos um animal tratado, em todas as doses, apresentou eventos de piloereção, tremores e letargia. Alguns animais dos dois grupos de maior dose apresentaram vocalização. Durante o experimento, foram a óbito onze animais do grupo 4X (após 4 a 13 dias de tratamento) e treze animais do grupo 8X (após 2 a 12 dias de tratamento). Grande parte dos animais que foram a óbito apresentaram convulsão.

Pelo menos um animal em todos os grupos apresentou dilatação do estômago, e de 3 a 10 animais por grupo apresentou intestino dilatado. Estas observações não tiveram relação com a dose. Foi encontrado pontos de gordura no fígado em um animal de cada grupo tratado a partir da dose 2X. Não se observou qualquer alteração patológica visível nos demais órgãos (coração, cérebro, baço, rins e pulmão), tanto de animais do grupo controle quanto nos animais dos grupos tratados. Não foi possível realizar a necropsia nos animais que morreram durante a madrugada (4 do grupo 4X e 5 do grupo 8X).

Tabela 1. Sinais clínicos de toxicidade e alterações macroscópicas de órgãos de ratas *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca durante o período gestacional (6° ao 20° dia).

Tratamento	Ayahuasca (mg/kg pc)				
	Controle n=25	1X n=25	2X n=25	4X n=25	8X n=25
<i>Sinais clínicos de toxicidade*</i>					
Piloereção	3 (1)	29 (11)	19 (15)	85 (23)	93 (23)
Tremores	0	7 (4)	2 (2)	49 (17)	69 (20)
Vocalização	0	0	0	8 (5)	3 (3)
Letargia	0	4 (2)	6 (5)	35 (17)	45 (15)
Cromodacriorréia	0	0	0	0	5 (5)
Morte	0	0	0	11	13
<i>Alterações macroscópicas dos órgãos**</i>				n=21	n=20
Estômago dilatado	1	10	4	1	6
Intestino dilatado	6	9	8	3	10

* número de eventos (número de fêmeas); ** número de fêmeas.

A Tabela 2 mostra os resultados de ganho de peso corporal, consumo de ração e peso do útero de ratas *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca durante o período do estudo. Em média, as ratas tratadas consumiram menos ração que aquelas do grupo controle, porém esta diferença não levou a uma alteração significativa do peso corporal no final do experimento (dia 21). Ao longo do experimento houve variação no ganho de peso em alguns momentos em alguns grupos tratados com relação ao grupo controle, porém sem relação com a dose.

O peso do útero gravídico de ratas no grupo de maior dose (8X) foi significativamente menor que o controle e os grupos 1X e 4X, levando a um ganho de peso materno corrigido, $D \text{ Peso} = [(\text{peso final} - \text{peso inicial}) - \text{peso do útero}]$, maior neste grupo em relação ao controle. A redução deste parâmetro é um indicador de toxicidade materna, visto que reflete a alteração de ganho de peso da mãe independente de alterações de peso das ninhadas.

Tabela 2 – Resultados das alterações de peso corporal, peso do útero e consumo de ração de ratas *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses, do 6 ° ao 21 ° dia de gestação.

Tratamento	Controle (n=25)	Ayahuasca (mg/kg p.c.)			
		1X (n=25)	2X (n=25)	4X (n=14)	8X (n=12)
<i>Consumo de ração (g)</i>					
Dia 6 até Dia 9	61,4±13,6 ^a	43±7,2 ^b	57,7±10,9 ^a	38,6±11,1 ^c	40,6±10,6 ^{b,c}
Dia 9 até Dia 12	62,8±12,3 ^a	45,8±12,7 ^b	64,4±10,1 ^a	41±18,3 ^b	40,9±11,7 ^b
Dia 12 até Dia 15	62±11,6 ^a	46,6±14,1 ^b	66±13,5 ^a	48,2±14,7 ^b	48,7±12,2 ^b
Dia 15 até Dia 18	61,3±9,9 ^a	54,3±10,9 ^{b,c}	61,7±10,6 ^a	55,4±14,6 ^{a,c}	46±10 ^{b,c}
Dia 18 até Dia 21	62,8±12,3 ^a	56,7±13,4 ^{a,b}	59,4±12,2 ^{a,c}	54,4±12,3 ^{b,c}	48,2±15,3 ^b
<i>Peso materno (g)</i>					
Dia 0	258,9±13,5	254,6±14,3	258,4±12,7	252,1±12,0	262,2±12,8
Dia 21	344,4±21,8	332,8±33,5	324,4±27,1	320,3±26,8	331,3±24,5
<i>Ganho de peso materno (g)</i>					
Dia 6 – Dia 0	11,6±6,3 ^a	13,6±9,1 ^{a,b}	16,5±7,3 ^b	12,5±6,6 ^{a,b}	18,8±8,9 ^b
Dia 9- Dia 6	6,9±7,4 ^a	5,6±9,2 ^{a,b}	1,9±10,7 ^b	5,2±9 ^{a,b}	5,8±7,4 ^{a,b}
Dia 12- Dia 9	10,5±5,2	7,1±7,8	8,2±12,2	8,3±5,5	7,8±4,8
Dia 15- Dia 12	12,9±8,2 ^a	12,3±11,5 ^{a,b}	8,3±10,5 ^{a,b}	5,9±5,7 ^b	7,5±7,2 ^b
Dia 18- Dia 15	18,2±10,1	12,4±14,8	14,2±9,8	16,6±12,4	12±8,3
Dia 21- Dia 18	25,4±12,8 ^{a,b}	27,3±13,1 ^b	16,9±16,4 ^a	19,6±9,3 ^a	17,1±16,6 ^a
Dia 21- Dia 0	85,5±23 ^a	78,2±28,2 ^{a,b}	66±24,6 ^b	68,2±22,5 ^b	69±25 ^{a,b}
<i>Peso do útero (g)</i>					
<i>D Peso</i>	63,3±16,3 ^a	51,1±20,1 ^{a,c}	45,7±19,7 ^{b,c}	54,6±16,4 ^{a,c}	31,8±21,6 ^b
	22,2±23,1 ^{a,c}	27±18 ^a	20,2±15,6 ^{a,c}	13,6±10,9 ^c	37,2±14,9 ^b

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por letras diferentes. Os resultados como: peso materno, peso do útero gravídico e D Peso foram analisados pelo teste ANOVA seguido de *Tukey*. Os resultados de ganho de peso materno e consumo de ração foram analisados por *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*. D Peso = [(peso final – peso inicial) – peso do útero].

As Figuras 1, 2 e 3 representam os resultados do peso relativo (peso do órgão em relação ao peso corpóreo) dos órgãos maternos. Não foram verificadas diferenças significativas no peso relativo do fígado, baço, rins e cérebro (Figura 1), porém foi

verificado um aumento significativo no peso do estômago nas doses 1X, 2X e 8X em relação ao grupo controle (Figura 2) e o coração apresentou um aumento significativo na dose de 2X em relação ao grupo controle (Figura 3).

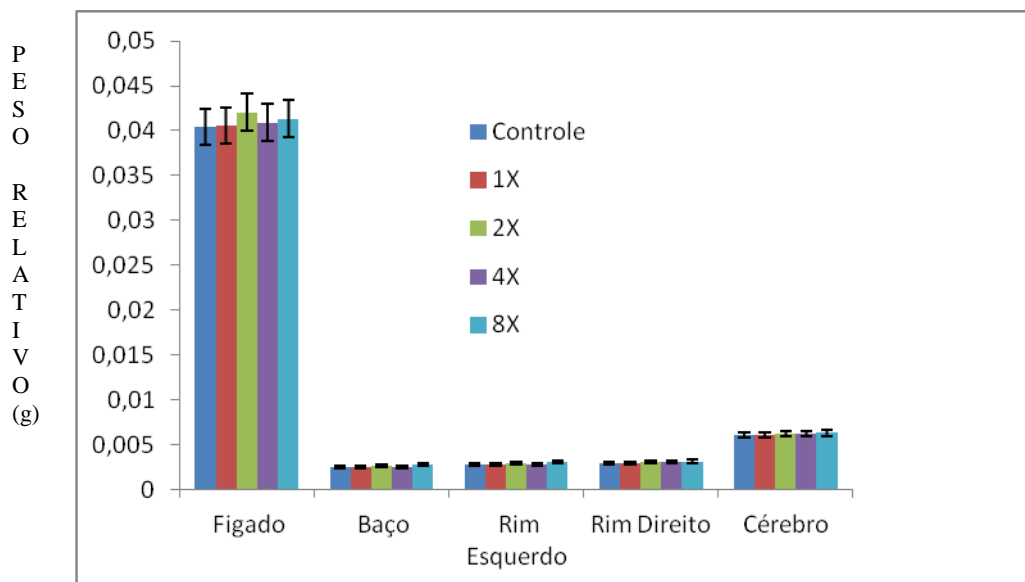


Figura 1. Resultados das alterações de peso relativo dos órgãos fígado, rins, baço e cérebro de ratas *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses de tratamento, do 6 ° ao 21 ° dia de gestação. Em todos os casos, não foi encontrada diferença estatística entre controles e tratados. Peso relativo: peso do órgão em relação ao peso corpóreo.

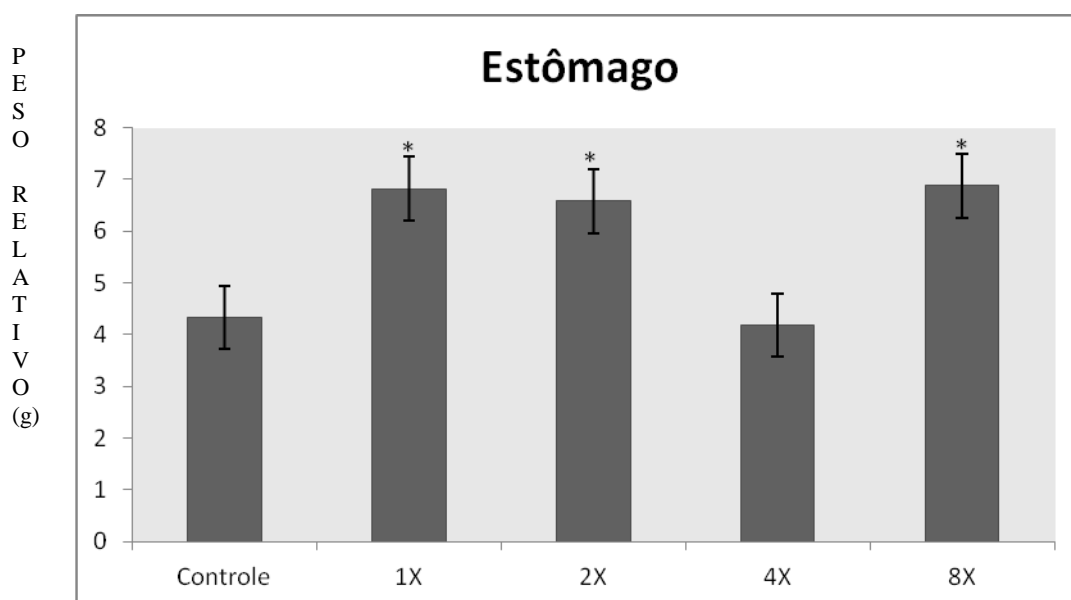


Figura 2. Resultados das alterações de peso relativo do estômago de ratas *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses de tratamento, do 6 ° ao 21 ° dia de gestação. Em todos os casos, a diferença em relação ao grupo controle, foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por *. Peso relativo: peso

do órgão em relação ao peso corpóreo. Os resultados foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

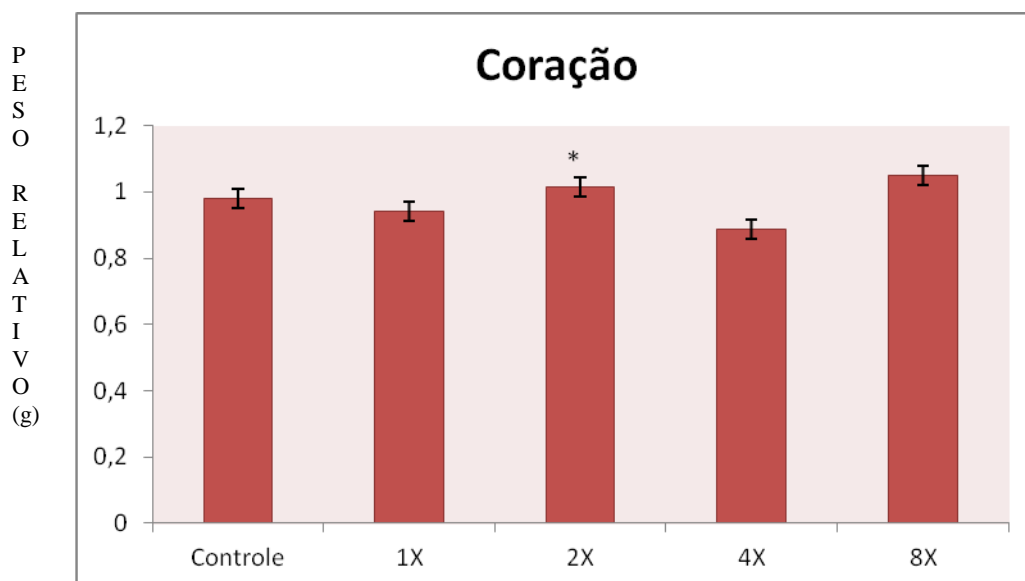


Figura 3. Resultados das alterações de peso relativo do coração de ratos *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses de tratamento, do 6 ° ao 21 ° dia de gestação. Em todos os casos, a diferença em relação ao grupo controle, foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por *. Peso relativo: peso do órgão em relação ao peso corpóreo. Os resultados foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

A Tabela 3 mostra índices reprodutivos dos animais controle e tratados. Não houve diferença significativa no número de corpos lúteos e sítios de implantação nas ratas controles e tratadas. Porém, ratas tratadas tiveram um maior número de reabsorções totais e precoce que ratas controle. A ingestão do chá parece ter alterado a distribuição dos fetos nos lados esquerdo e direito do útero, porém a relação com a dose não ficou clara, provavelmente devido ao menor número de animais nas doses superiores. O menor peso do útero gravídico no grupo de maior dose se deve a embriofetotoxicidade nesta dose, visto que, pode estar refletindo o aumento no número de reabsorções e também o menor peso dos fetos sobreviventes.

Tabela 3 – Resultados dos parâmetros maternos avaliados por ocasião da cesárea, realizada no 21º dia gestacional, de ratas *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca nas diferentes doses.

Tratamento N por Ninhada	Ayahuasca (mg/kg p.c.)				
	Controle (n=25)	1X (n=25)	2X (n=25)	4X (n=14)	8X (n=12)
<i>Corpos Lúteos</i>	11,7±1,8	12,0±1,4	12,5±2,3	10,6±2	13,2±3,8
<i>Sítios de Implantação</i>	9,8±2	8,8±2,9	8,8±2,9	9,3±2,3	8,6±3,2
<i>Reabsorções</i>					
Total	0,6±0,8 ^a	1,4±1,4 ^b	2,1±1,8 ^b	1,4±1,3 ^b	3,9±4,5 ^b
Precoce	0,2±0,4 ^a	0,9±0,8 ^b	1,6±1,8 ^b	1,1±1,1 ^b	1,7±2,5 ^b
Intermediária	0,4±0,7	0,5±0,9	0,5±1	0,4±0,7	1,1±2,9
Tardia	0±0	0,1±0,3	0±0	0±0	1,1±3,7
<i>Números de fetos: lados uterinos</i>					
Direito	4,4±1,2 ^a	4,0±1,9 ^{a,c}	3,3±1,4 ^{b,c}	4,5±1,5 ^a	2,7±1,7 ^{b,c}
Esquerdo	4,8±2,1 ^a	3,4±1,9 ^b	3,4±2,2 ^{b,c}	3,4±2,1 ^{a,b,c}	1,9±2 ^c

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. Em todos os casos, a diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por letras diferentes. Os resultados foram analisados pelo *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

Em resumo, os resultados das alterações de sinais clínicos, alterações macroscópicas nos órgãos, menor consumo de ração, menor peso do útero gravídico e maior número de reabsorções indicam que, o tratamento com o chá de ayahuasca provoca toxicidade no organismo materno e nas maiores doses (4X e 8X) isso fica claro com as mortes animais.

Embriofetotoxicidade

A Tabela 4 mostra os parâmetros fetais dos animais dos grupos controle e tratados. Em média, ratas tratadas com ayahuasca tiveram um menor número de fetos e um menor número de fetos vivos que ratas do grupo controle, com exceção das ratas do grupo 4X, cujo resultado não foi estatisticamente diferente do controle. Não houve diferença significativa entre o peso da placenta das ratas do grupo controle e dos grupos tratados, nem da medida corpórea dos fetos entre os grupos. Porém, fetos do grupo de maior dose (8X) apresentaram menor peso corpóreo que aqueles dos grupos controle, 1X e 2X, sugerindo um retardo no crescimento fetal.

Tabela 4. Parâmetros fetais avaliados por ocasião da cesárea (21º dia gestacional) de ratas *Wistar* controles e tratadas com ayahuasca.

Tratamento	Controle (n=25)	Ayahuasca (mg/kg p.c.)			
		1X (n=25)	2X (n=25)	4X (n=14)	8X (n=12)
Número Total de Fetos	9,2±2,3 ^a	7,4±3,1 ^b	6,5±3,1 ^{b,c}	7,8±2,6 ^{a,b}	4,7±3,3 ^c
Número de Fetos Vivos	9,2±2,3 ^a	5,8±3,8 ^{b,c}	6,5±3,1 ^{b,c}	7,6±2,7 ^{a,c}	4,7±3,3 ^b
Número de Fetos Mortos	0±0,2 ^{a,b}	1,6±3,7 ^a	0±0 ^b	0,1±0,4 ^{a,b}	0±0 ^{a,b}
Número de Fêmeas	4,8±1,4 ^a	3,9±1,5 ^b	2,7±1,8 ^c	4,9±1,8 ^a	2,7±1,9 ^{b,c}
Número de Machos	4,4±1,9 ^a	3,5±2 ^{a,c}	3,8±2,3 ^{a,c}	3±1,7 ^{b,c}	1,9±1,7 ^b
Machos/Fêmeas	111/119	88/97	94/68	42/68	23/33
Peso Placenta (g)	0,6±0 ^a	0,6±0,2 ^{a,c}	0,6±0,1 ^{b,c}	0,6±0,1 ^{a,b}	0,5±0,3 ^{a,b}
Peso Corpóreo Fetal (g)	4,8±0,7 ^a	4,3±1 ^a	4,5±0,7 ^a	4,5±0,7 ^{a,b}	3,1±1,9 ^b
Medida Corpórea Fetal (mm)	39±3,1 ^{a,b}	39,3±3,9 ^a	39,5±2,6 ^a	39±2,8 ^{a,b}	29,9±15 ^b

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão. A diferença foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por letras diferentes. Os resultados foram analisados pelo *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

A Figura 4 mostra o peso médio relativo dos órgãos fetais rim e timo, por ninhada, onde nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos controle e tratados. Porém, encontrou-se diminuição significativa do peso do baço na maior dose quando comparado com o grupo controle (Figura 5).

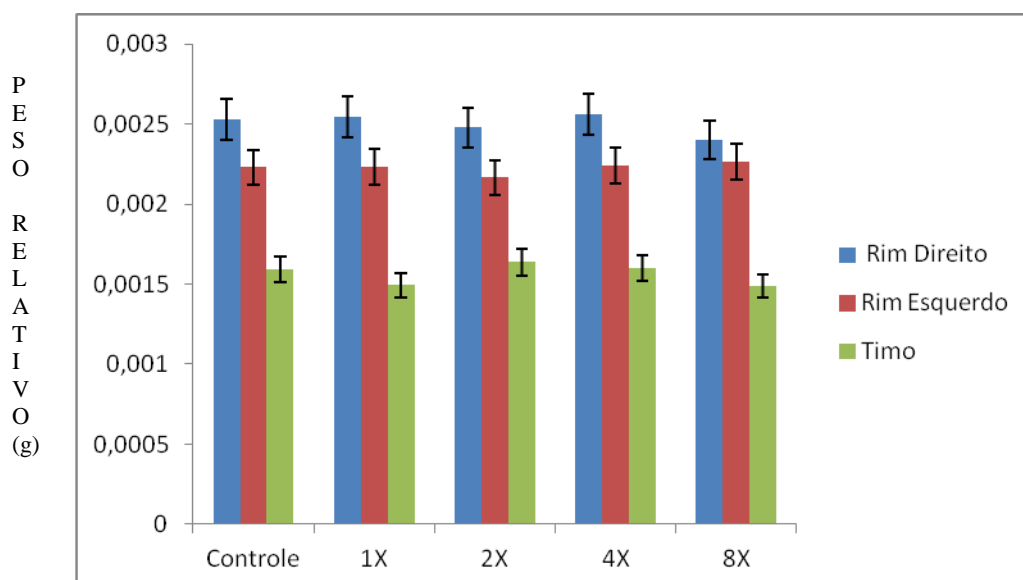


Figura 4. Resultados das alterações do peso relativo dos rins e timo dos fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca nas diferentes doses de tratamento do 6º ao 20º dia gestacional.

Em todos os casos, não foi encontrada diferença estatística entre controles e tratados. Peso relativo: peso do órgão em relação ao peso corpóreo.

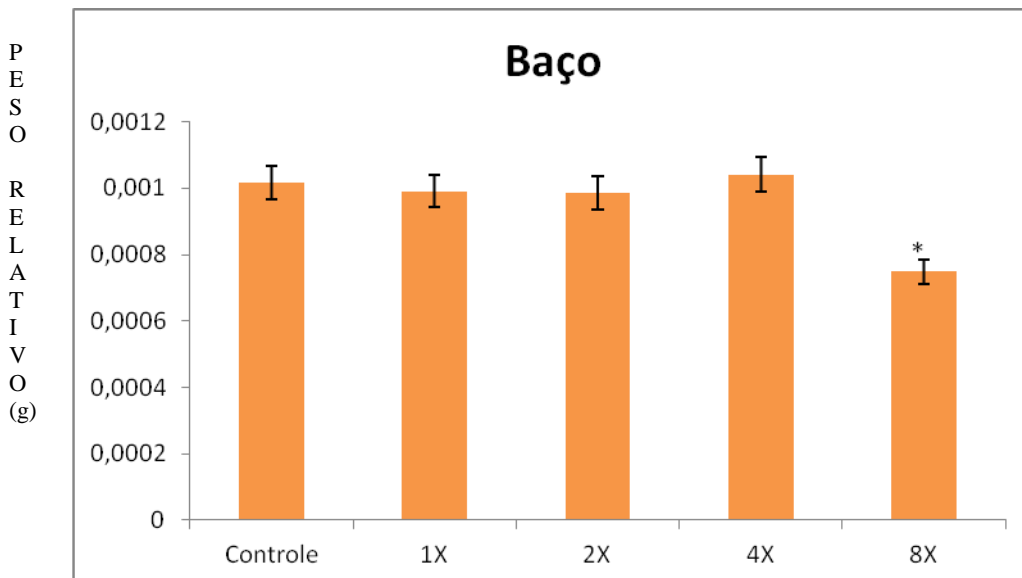


Figura 5. Resultados das alterações de peso relativo do baço dos fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca nas diferentes doses (1X, 2X, 4X e 8X) do 6º ao 20º dia gestacional. A diferença em relação ao grupo controle foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por *. Peso relativo: peso do órgão em relação ao peso corpóreo. Os resultados foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

O fígado (Figura 6) e o coração (Figura 7) apresentaram aumento em todas as doses de tratamento quando comparadas ao controle. O pulmão apresentou uma redução significativa de peso nas menores doses (1X e 2X) e um aumento nas maiores doses (4X e 8X) (Figura 8).

Estes resultados demonstram uma tendência ao retardo de crescimento intra-uterino dos fetos tratados *in utero*. Essas reduções de peso podem estar relacionadas à vulnerabilidade de determinados órgãos ao tratamento. Porém também há relatos de aumento de peso de órgãos o que pode indicar um sinal tóxico no órgão.

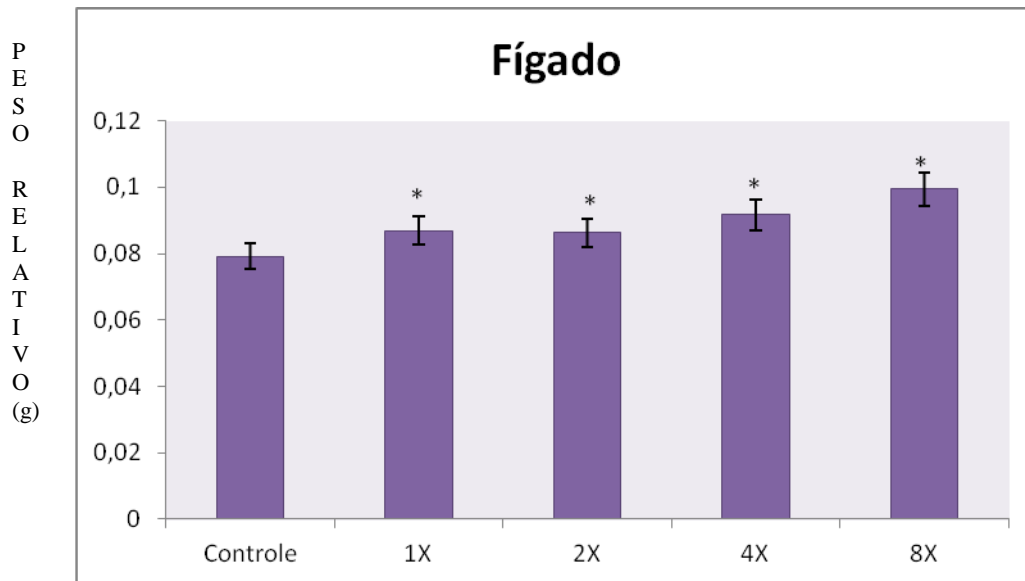


Figura 6. Resultados das alterações de peso relativo do fígado dos fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6º ao 20º dia gestacional. A diferença em relação ao grupo controle foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por *. Peso relativo: peso do órgão em relação ao peso corpóreo. Os resultados foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

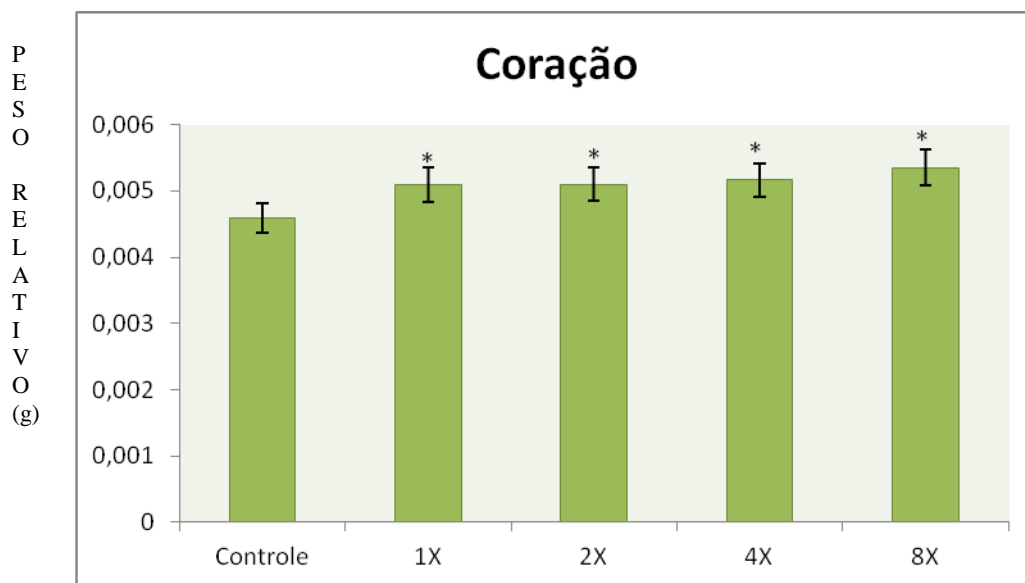


Figura 7. Resultados das alterações de peso relativo do coração dos fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca nas diferentes doses do 6º ao 20º dia gestacional. A diferença em relação ao grupo controle foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por *. Peso relativo: peso do órgão em relação ao peso corpóreo. Os resultados foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

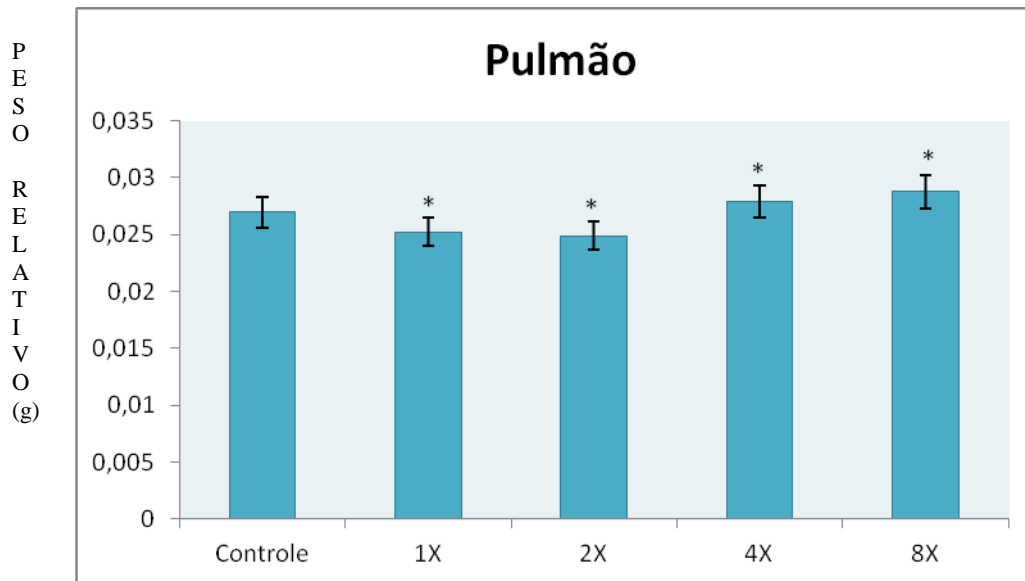


Figura 8. Resultados das alterações de peso relativo do pulmão dos fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca nas diferentes doses (1X, 2X, 4X e 8X) do 6º ao 20º dia gestacional. A diferença em relação ao grupo controle foi considerada estatisticamente significativa quando $p \leq 0,05$, sendo representado por *. Peso relativo: peso do órgão em relação ao peso corpóreo. Os resultados foram analisados pelo teste *Kruskal-Wallis* seguido de *U Mann-Whitney*.

Por ocasião da cesariana, logo após a abertura do útero, cada feto foi separado da placenta e analisado minuciosamente para verificação da ocorrência de anomalias externas visíveis. Esta análise não demonstrou o aparecimento de qualquer anomalia tanto no grupo controle quando nos tratados nas diferentes doses. O exame de anomalias viscerais, após microdissecação e exame detalhado dos órgãos, mostrou várias anomalias, com os resultados resumidos na Tabela 5. Para cada anomalia observada, os resultados são apresentados em número total de anomalias em relação ao número de fetos analisados e aos fetos com anomalia (mais de uma anomalia por feto) e em relação à ninhadas. As Figuras 9 a 17 ilustram as anomalias observadas nos fetos.

Houve um maior número de anomalias nos fetos tratados relacionados a fissura (Figura 9) e forma dos lóbulos do fígado (Figura 10), posicionamento de testículo (Figura 12), posicionamento de ovários (Figura 13) e forma do útero (Figura 14). Em relação ao posicionamento dos rins houve diferença significativa entre controles e as duas maiores doses do tratamento (4X e 8X) (Figura 15) e foi observado ureter com forma irregular nas doses a partir de 2X em relação ao controle (Figura 16). Também foi observado diferença estatisticamente significante em relação ao terceiro corte cerebral entre grupos controles e tratados nas doses de 1X e 8X onde o terceiro ventrículo e os ventrículos laterais

apresentaram-se mais dilatados (Figura 17). Notou-se uma tendência à formação de lóbulos extra no fígado, mas não foram significativas (Figura 11).

Tabela 5. Ocorrência de anomalias viscerais em fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6º ao 20º dia gestacional.

Anomalias	Controle	1X	2X	4X	8X
<i>Fissuras em lóbulos do fígado</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	33/94 (35%)	57/83 (68%)	46/70 (65%)	47/54 (87%)	18/22 (81%)
Total anomalias / fetos com anomalia	33/25 (132%)	57/48 (118%)	46/41 (112%)	47/41 (114%)	18/16 (112%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	11/25 (44%)	16/25 (64%)	15/25 (60%)	13/14 (92%)	7/9 (77%)
<i>Forma irregular em lóbulos do fígado</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	12/94 (12%)	72/83 (86%)	66/70 (94%)	66/54 (122%)	32/22 (145%)
Total anomalias / fetos com anomalia	12/11 (109%)	72/51 (141%)	66/46 (143%)	66/44 (150%)	32/18 (177%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	8/25 (32%)	15/25 (60%)	17/25 (68%)	14/14 (100%)	8/9 (88%)
<i>Lóbulo extra no fígado</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	5/94 (5%)	9/83 (10%)	5/70 (7%)	4/54 (7%)	2/22 (9%)
Total anomalias / fetos com anomalia	5/5 (100%)	9/8 (112%)	5/5 (100%)	4/4 (100%)	2/2 (100%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	5/25 (20%)	4/25 (16%)	4/25 (16%)	3/14 (21%)	1/9 (11%)
<i>Testículo em posição irregular</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	1/94 (1%)	9/83 (10%)	7/70 (10%)	4/54 (7%)	3/22 (13%)
Total anomalias / fetos com anomalia	1/1 (100%)	9/9 (100%)	7/7 (100%)	4/4 (100%)	3/3 (100%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	1/25 (4%)	7/25 (28%)	7/25 (28%)	3/14 (21%)	3/9 (33%)
<i>Ovário em posição irregular</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	0	11/83 (13%)	2/70 (2%)	2/54 (3%)	1/22 (4%)
Total anomalias / fetos com anomalia	0	11/9 (22%)	2/2 (100%)	2/2 (100%)	1/1 (100%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	0	8/25 (32%)	2/25 (8%)	1/14 (7%)	1/9 (11%)
<i>Ovário com forma irregular</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	1/94 (1%)	0	1/70 (1%)	2/54 (3%)	0
Total anomalias / fetos com anomalia	1/1 (100%)	0	1/1 (100%)	2/2 (100%)	0

Anomalias	Controle	1X	2X	4X	8X
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	1/25 (4%)	0	1/25 (4%)	1/14 (7%)	0
<i>Útero sem ovários</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	0	2/83 (2%)	1/70 (1%)	0	0
Total anomalias / fetos com anomalia	0	2/2 (100%)	1/1 (100%)	0	0
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	0	1/25 (4%)	1/25 (4%)	0	0
<i>Útero com forma irregular</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	0	2/83 (2%)	1/70 (1%)	2/54 (3%)	1/22 (4%)
Total anomalias / fetos com anomalia	0	2/2 (100%)	1/1 (100%)	2/2 (100%)	1/1 (100%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	0	2/25 (8%)	1/25 (4%)	2/14 (14%)	1/9 (11%)
<i>Útero em posição irregular</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	0	0	0	1/54 (1%)	0
Total anomalias / fetos com anomalia	0	0	0	1/1 (100%)	0
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	0	0	0	1/14 (7%)	0
<i>Rim em posição irregular</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	0	1/83 (1%)	0	5/54 (9%)	1/22 (4%)
Total anomalias / fetos com anomalia	0	1/1 (100%)	0	5/5 (100%)	1/1 (100%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	0	1/25 (4%)	0	4/14 (28%)	1/9 (11%)
<i>Ureter com forma irregular</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	0	0	4/70 (5%)	14/54 (25%)	6/22 (27%)
Total anomalias / fetos com anomalia	0	0	4/3 (133%)	14/14 (100%)	6/6 (100%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	0	0	3/25 (12%)	8/14 (57%)	3/9 (33%)
<i>3º corte cerebral (ventrículos laterais e 3º ventrículo dilatados)</i>					
Total anomalias/ fetos analisados	0	6/83 (7%)	1/70 (1%)	1/54 (1%)	1/22 (4%)
Total anomalias / fetos com anomalia	0	6/6 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)
Ninhadas com anomalia/ total de ninhadas	0	3/25 (12%)	1/25 (4%)	1/14 (7%)	1/9 (11%)

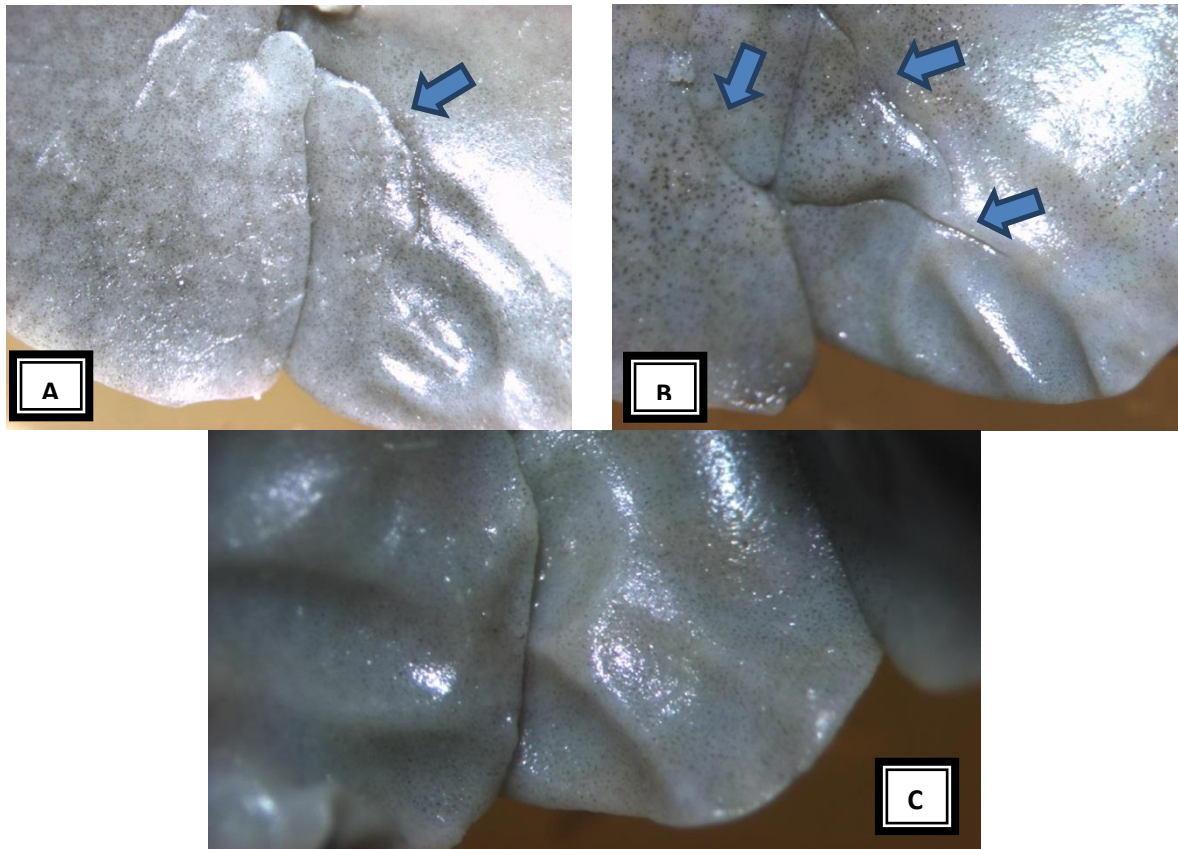


Figura 9. Lóbulos com fissuras de fígado dos fetos expostos a chá de ayahuasca *in utero* do 6° ao 20° dia de gestação. Aumento de esteriomicroscópio 6X A) Tratado com 2X. B) Tratado com 4X. C) Controle ilustrando morfologia normal.

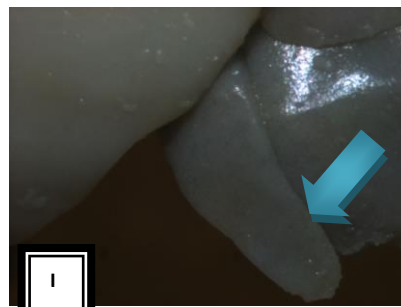
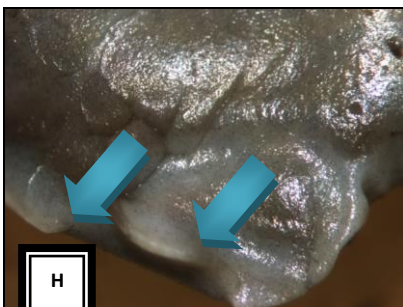
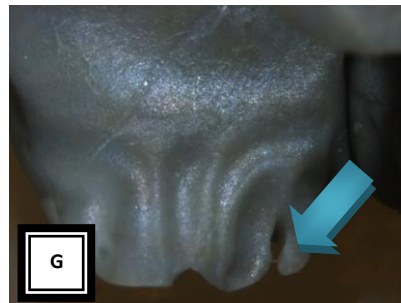
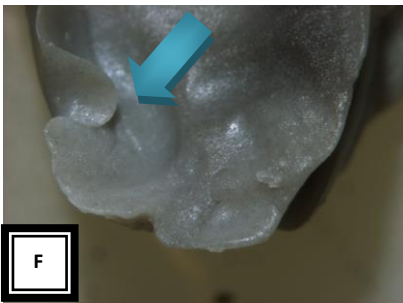
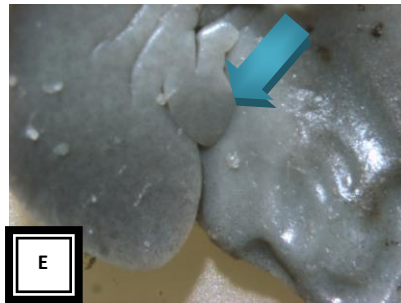
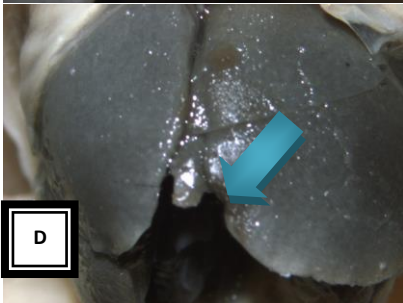
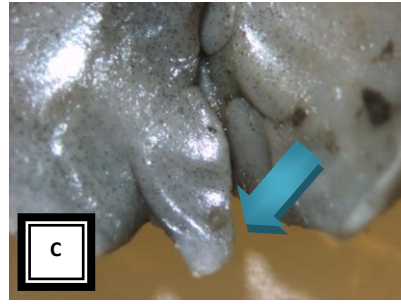
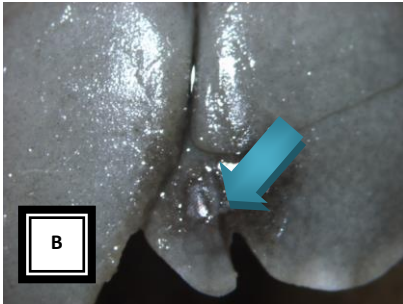


Figura 10. Lóbulos do fígado A) Controle ilustrando morfologia normal. Demais tratados: lóbulos de fígado com forma irregular de fetos expostos *in utero* a chá de ayahuasca do 6^o ao 20^o dia de gestação. B) e C) Tratado com 1X. Aumento de esteriomicroscópio 8X. D) e E) Tratado com 2X. Aumento de esteriomicroscópio 6X e 8X, respectivamente. F) e G) Tratado com 4X. Aumento de esteriomicroscópio 10X. H) e I) Tratado com 8X. Aumento de esteriomicroscópio 12X e 16X, respectivamente.

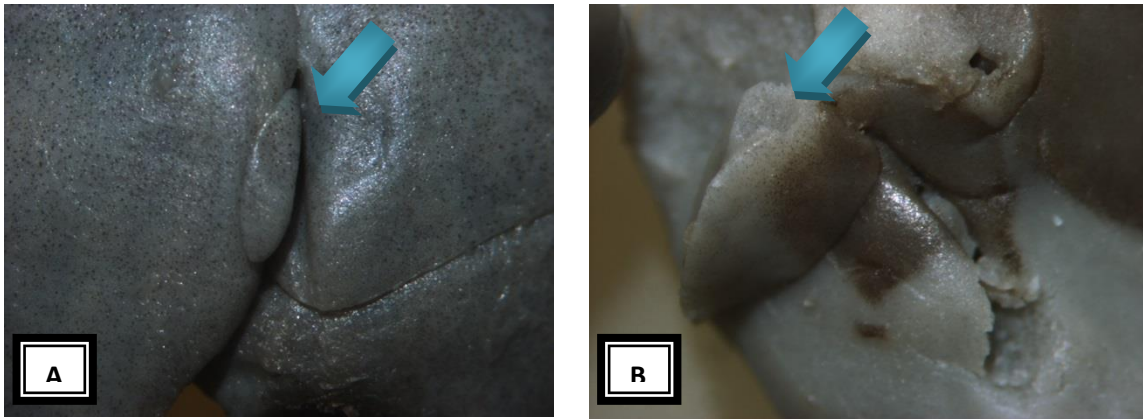


Figura 11. Lóbulo extra no fígado de fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6° ao 20° dia de gestação. A) Tratado com 1X. B) Tratado com 8X. Aumento de esteriomicroscópio 10X e 12X, respectivamente.

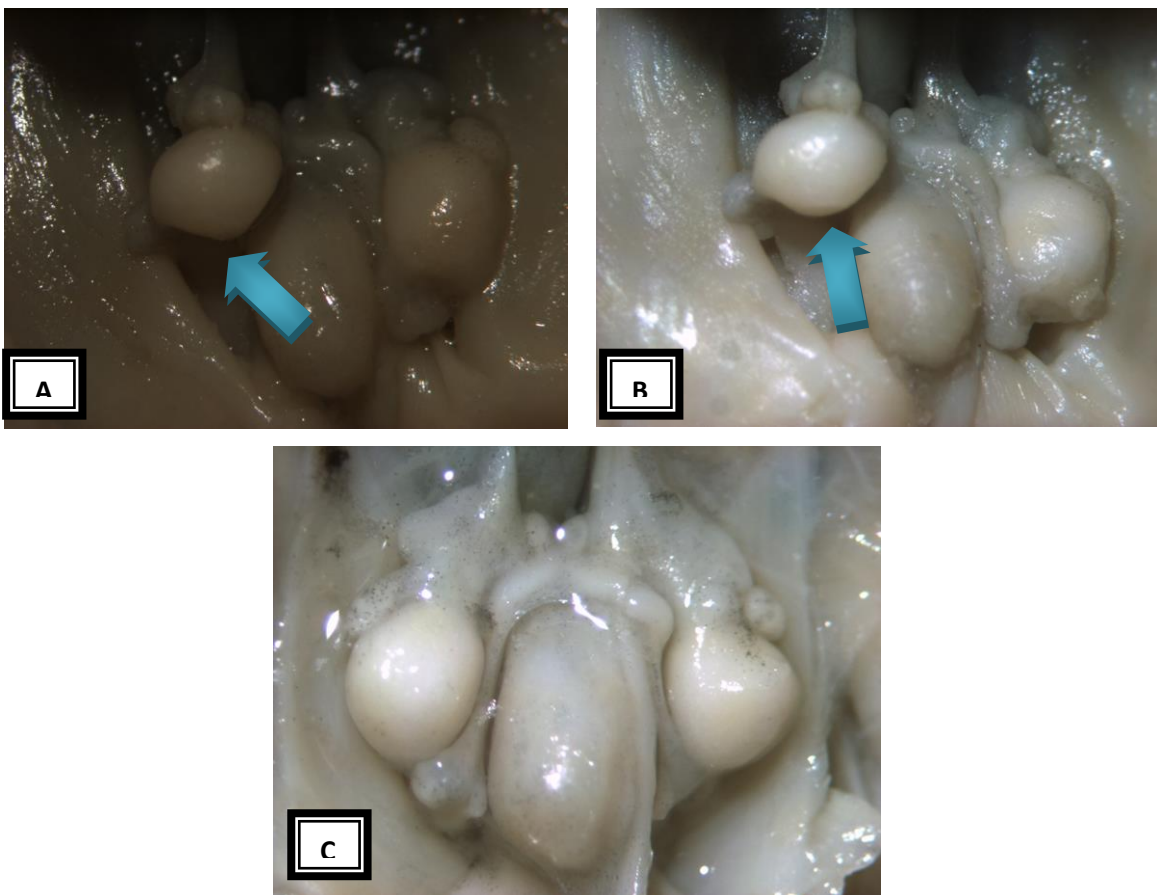


Figura 12. Testículo em posição irregular de fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6° ao 20° dia de gestação. Aumento de esteriomicroscópio 10X. A) Tratado com 4X. B) Tratado com 8X. C) Controle ilustrando morfologia normal.

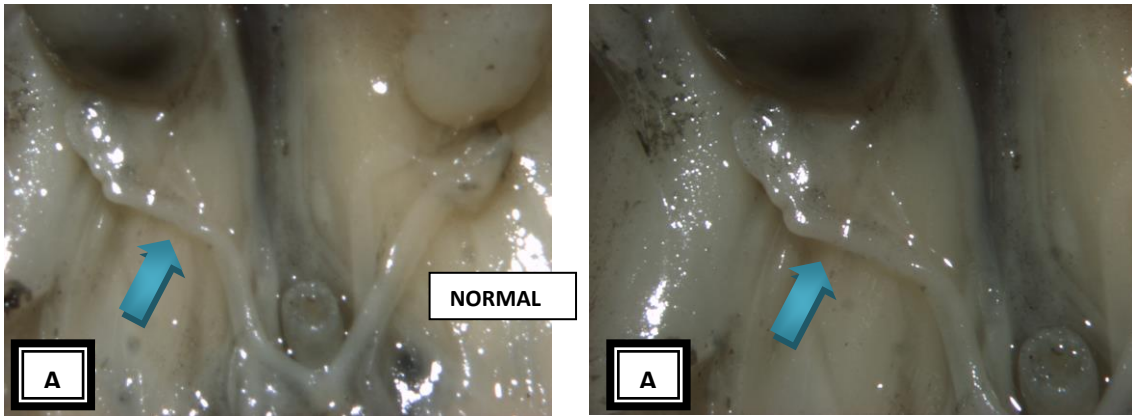


Figura 13. Ovário em posição irregular de fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6° ao 20° dia de gestação. A) Tratado com 8X. Aumento de esteriomicroscópio 8X e 10X, respectivamente.

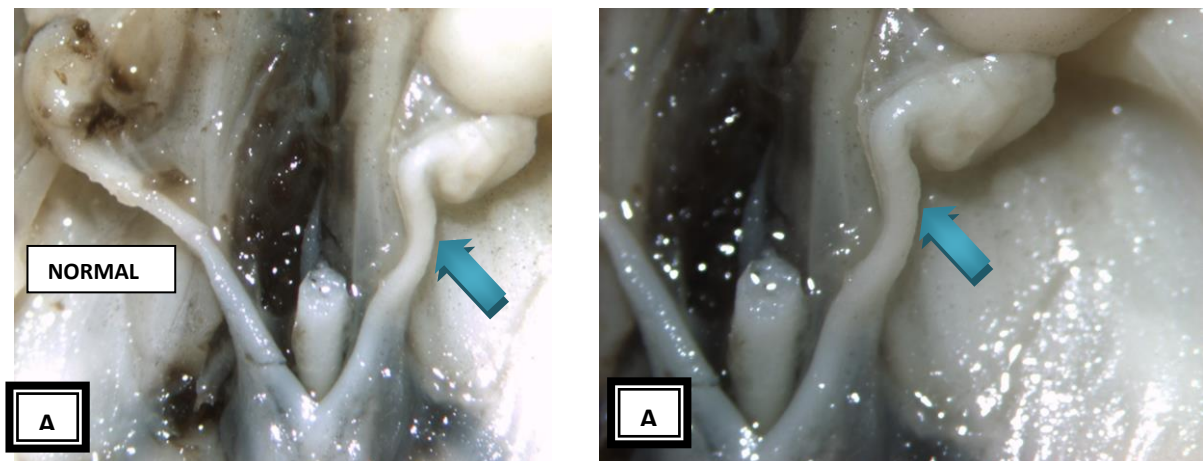


Figura 14. Útero em forma irregular de fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6° ao 20° dia de gestação. A) Tratado com 8X. Aumento de esteriomicroscópio 8X e 12X, respectivamente.

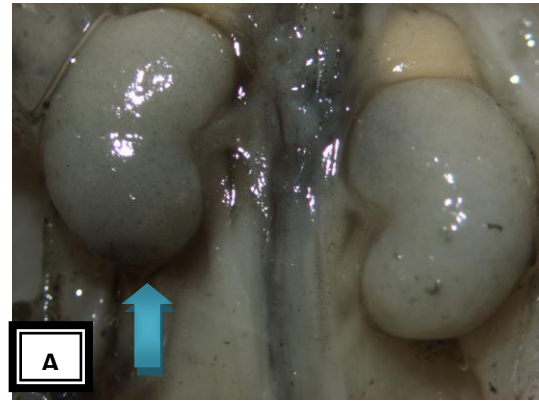
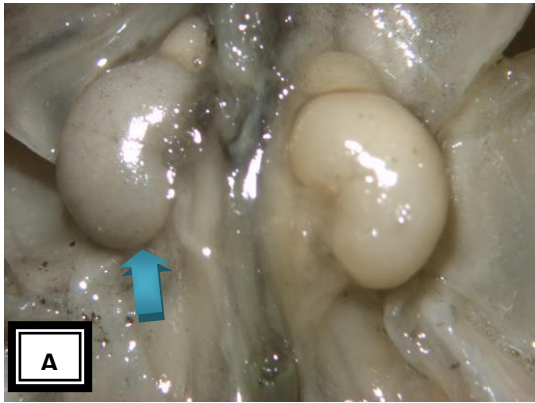


Figura 15. Rim em posição irregular de fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6^o ao 20^o dia de gestação. A) Tratado com 4X A) Tratado com 8X. Aumento de esteriomicroscópio 6X e 8X, respectivamente.

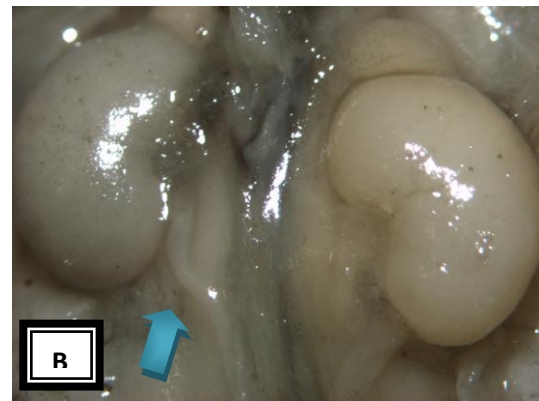
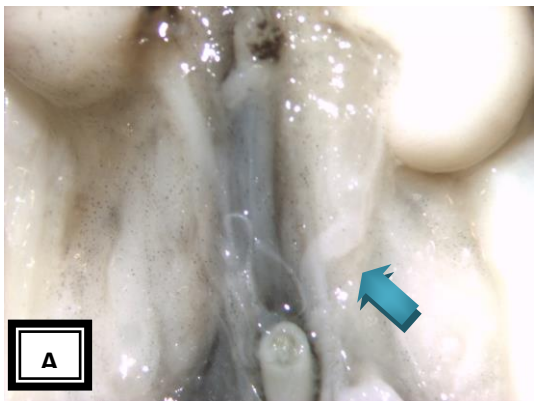


Figura 16. Ureter em forma irregular de fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6^o ao 20^o dia de gestação. A) Tratado com 4X B) Tratado com 8X. Aumento de esteriomicroscópio 10X e 8X, respectivamente.

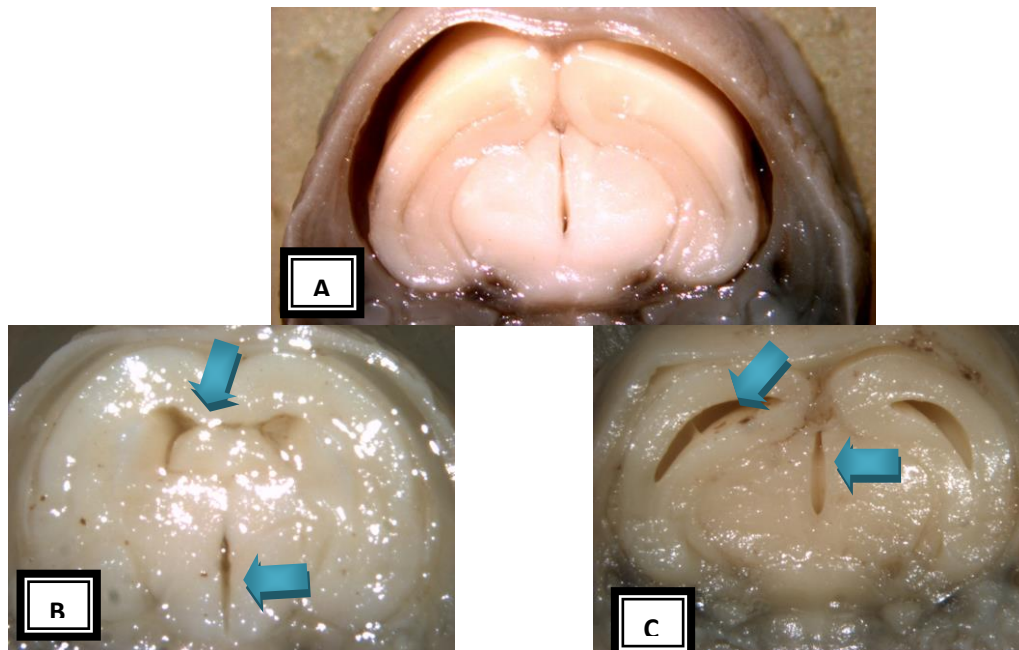


Figura 17. Terceiro corte cerebral: terceiro ventrículo e ventrículos laterais dilatados de fetos expostos *in utero* ao chá de ayahuasca do 6° ao 20° dia de gestação. A) Feto controle, ilustração da morfologia normal, aumento de esteriomicroscópio 6X. B) Tratado com 4X; C) Tratado com 8X. Aumento de esteriomicroscópio 8X

Um único feto apresentou anofalmia na dose de 1X de tratamento e foi considerado apenas uma malformação casual individual não estando relacionado com o tratamento (Figura 18).

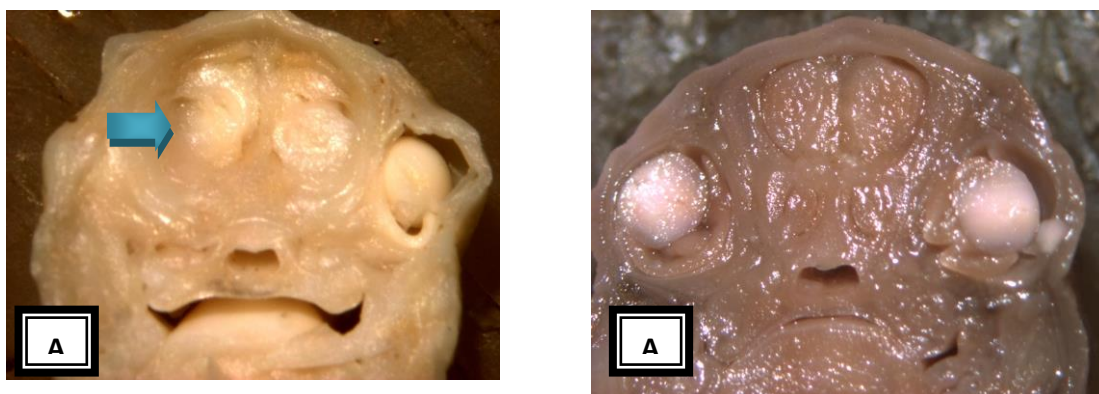


Figura 18. A) Anofalmia em feto exposto *in utero* a 1X de chá ayahuasca do 6° ao 20° dia de gestação; B) Controle ilustrando morfologia normal. Aumento de esteriomicroscópio de 8X.

4. Discussão

É bem conhecido que doenças e alterações de ordem funcional ou metabólica ao organismo materno, se suficientemente severas, podem afetar adversamente o desenvolvimento embriofetal. Alguns toxicologistas acreditam que, em doses suficientemente altas para produzir acentuada toxicidade materna, praticamente todas as substâncias são capazes de afetar adversamente o desenvolvimento embriofetal (Miranda *et al.*, 2006).

Nesse estudo, o chá de ayahuasca (*Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis*) foi administrado em ratas prenhes durante o período de implantação embrionária até o final da gestação (6º ao 20º dia), segundo o protocolo OECD-414. A implantação é um processo pelo qual o embrião adquire uma posição estável no endométrio, de modo a tornar possível a manutenção de um sistema de trocas metabólicas entre o organismo materno e embrionário. Em ratos, esse processo se inicia por volta do 6º dia de gestação, (Abrahamsohn, 1993).

Segundo Chahoud (1999) a toxicidade do desenvolvimento pode ocorrer por efeitos diretos (feto ou embrião) ou por efeitos indiretos (toxicidade materna ou placentária). Exposição materna na maioria das vezes resultam em efeitos diretos e indiretos, principalmente relacionados a diminuição no ganho de peso e do consumo de ração, sinais clínicos, toxicidade para órgãos e mortalidade (Chahoud, 1999). Os resultados do presente estudo revelam que a administração pré-natal do chá de ayahuasca causou toxicidade materna nas maiores doses de tratamento que culminaram com as mortes de alguns animais.

Em estudo de embriofetotoxicidade *Segmento II*, tal como realizamos, o efeito embriofetotóxico pode se manifestar de três formas: embriofetalidade, retardo de crescimento intra-uterino e indução a malformações. Nosso estudo obteve como resultado essas três manifestações na maior dose de tratamento (8X), caracterizadas por redução no número de fetos vivos, redução de peso corporal fetal e peso de órgãos fetais e malformações viscerais, logo, fica evidente que o tratamento com o chá de ayahuasca nas condições do estudo induz a toxicidade fetal.

Nossos resultados entram em contradição com o único trabalho publicado com o chá da ayahuasca nesta mesma linha de pesquisa. Oliveira *et al.* (2010) realizaram um estudo com administração de ayahuasca em ratas prenhes do 6º ao 20º dia gestacional. Esses autores não encontraram qualquer sinal de toxicidade materna e todos os animais sobreviveram até o dia da eutanásia nas diferentes doses do tratamento. As maiores doses utilizadas pelos autores foram de 5X e 10X uma dose usual de 100 mL para uma pessoa de

70 kg, correspondendo a 7,15 e 14,3 mL do chá/kg p.c., respectivamente. No presente estudo, as maiores doses, onde observou-se letalidade, corresponderam a 8,6 e 17,2 mL/kg p.c. Esta diferença na resposta tóxica se deve provavelmente à diferença na composição do chá utilizado em ambos os estudos. No estudo de Oliveira *et al.*, o chá continha 1,37 mg/ml de hamina e 0,62 mg/ml de harmalina (~ 2 mg/mL total), 15% superior a encontrada no chá utilizado no presente estudo (~ 1.7 mg/mL total). Mais importante foi a diferença na concentração de DMT, quase 3 vezes maior no chá utilizado pelo grupo de Oliveira *et al.* Diferenças na composição química do chá da ayahuasca são esperadas, devido a fatores ambientais e de cultivo das plantas utilizadas, e da preparação da bebida. Cada mestre ayahuasqueiro tem sua maneira própria de preparo, com diferentes proporções entre o mariri (*Banisteriopsis caapi*) e a chacrona (*Psychotria viridis*), tempo de cozimento e diluição da bebida. Uma bebida com maior proporção de chacrona na sua preparação terá concentrações maiores de DMT em relação à β -carbolicinas. Estudos com as substâncias puras e misturas poderão esclarecer o melhor à toxicidade reprodutiva dos componentes da ayahuasca.

Corroborando nossos resultados, Oliveira *et al.*, (2010) relatam diminuição do ganho de peso materno, consumo de ração e peso individual fetal na maior dose de tratamento (10X). Em relação às anomalias viscerais vale destacar que nem toda alteração morfológica ou anomalia observada no feto tem o mesmo grau de importância. Algumas são de caráter incapacitante ou incompatíveis com a vida, e outras são classificadas como malformações menores ou apenas variações, (Miranda *et al.*, 2006). Neste projeto foram encontradas malformações viscerais que provavelmente comprometeriam a vida saudável do embrião, como as malformações nos órgãos reprodutores, rins, ureteres e a dilatação dos ventrículos laterais cerebrais e do 3^o ventrículo cerebral. As variações encontradas no fígado provavelmente não comprometeriam a vida do animal, já que este órgão tem um alto poder de regeneração. Um estudo com administração do chá de ayahuasca durante o desenvolvimento embrionário e durante o período pós-natal com o nascimento da prole seria a única maneira de confirmar se essas alterações viscerais comprometeriam de fato a vida do animal. Oliveira *et al.* (2010) também identificou como anomalia visceral a dilatação do 3^o ventrículo cerebral em todos os grupos de tratamento, além da dilatação da pelve renal. Ainda que não sejam as mesmas anomalias encontradas nesse estudo, vale destacar que ambas são consideradas malformações.

5- CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados revelam que a toxicidade oral aguda do chá de ayahuasca em ratos *Wistar* situa-se acima de 50X a dose utilizada em rituais religiosos da Igreja União do Vegetal, o que sugere uma baixa toxicidade oral para esta infusão. A avaliação do potencial neurotóxico do chá de ayahuasca, avaliados pelos testes de comportamento, sugere que este composto apresentou diminuição na locomoção, na atividade exploratória, no número de entradas nos braços fechados e aumentou o tempo de natação. Altas doses de ayahuasca (30X) ativa a *c-fos* nos núcleos amigdaloides, hipocampo e núcleos da rafe que culminaram com lesões neuronais.

A ingestão diária de ayahuasca por ratas *Wistar* prenhes em doses maiores que a usual (150 mL para pessoas de 70 Kg) pode representar alterações nos índices reprodutivos relativos ao grupo controle, incluindo diminuição do número de fetos e aumento do número de reabsorções. A ingestão diária do chá em doses de 4X e 8X levou a óbito cerca de 33,3 e 40% das ratas tratadas, respectivamente, caracterizando toxicidade materna. Em relação à exposição fetal *in utero* existe uma tendência à ação teratogênica em ratos, visto que, houve aumento na frequência de malformações viscerais, além de embriofetotoxicidade. Porém, esse estudo deverá ser complementado com as análises esqueléticas para uma conclusão mais detalhada.

É importante enfatizar que o consumo do chá da ayahuasca nos rituais religiosos ocorre normalmente a cada 15 dias e que o regime diário não representa a exposição normal no contexto religioso. Porém, este estudo mostrou que o uso abusivo desta bebida pode representar um risco para a saúde humana, principalmente para gestantes, inclusive levando a morte.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Abrahamsohn, P.A., Zorn, T.M., 1993. Implantation and decidualization in rodents. *Journal of Experimental Zoology* 266: 603-28.
- Bheringer, K., 1928. Über ein neues, auf das extrapyramidal-motorische system wirkendes alkaloid (Banisterin) 1: 265-75.
- Brent, R.L. What is the relationship between birth defects and pregnancy bleeding? 1993. *Teratology Research* 48: 93-95.
- Brito, A. R. M. S., Antonio, M. A., Costa, M., Carvalho, J. E., Dias, P. C., 1994. Efeitos farmacológicos do decocto (hoasca) de *Banisteriopsis caapi* e *Psychotria viridis* em camundongos. Resumos da IX Reunião Anual da FESBE, 203.
- Brito, G.S., 2004. Farmacologia humana da Hoasca (chá preparado de plantas alucinógenas usado em contexto ritual no Brasil). In: LABATE, B.C. & ARAÚJO, W.S. O uso ritual da ayahuasca. 2ª ed. Campinas, São Paulo: Mercado de Letras, 623-651.
- Bullitt, E., 1990. Expression of *c-fos-like* protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 22; 296 :517-30.
- Callaway, J. C., Raymon, L.P., Hearn, W.L., McKenna, D.J., Grob, C.S., Brito, G.S., Mash, D.C., 1996. Quantitation of N, N-dimethyltryptamine and harmala alkaloids in human plasma after oral dosing with ayahuasca. *Journal of Analytical Toxicology*, 20: 493-497.
- Callaway, J.C., Grob, C.S., 1998. Ayahuasca preparations and serotonin reuptake inhibitors: A potential combination for severe adverse reactions. *Journal of Psychoactive Drugs* 30: 367-369.
- Callaway, J.C., McKenna, D.J., Grob, C.S., Brito, G.S., Raymon, L.P., Poland, R.E., Andrade, E. N., Andrade, E. O., Mash, D.C., 1999. Pharmacokinetics of hoasca alkaloids in healthy humans. *Journal of Ethnopharmacology* 65: 243-256.
- CALLAWAY, J.C., 2005. Fast and slow metabolizers of hoasca. *Journal of Psychoactive. Drugs* 37: 1-5.
- Castagné V., Porsolt, R.D., 2009. Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *European Journal of Pharmacology* 616: 128-133.
- Cazenave, S.O.S., 1996. Alucinógenos. In: Olga, S. Fundamentos de Toxicologia, Atheneu, São Paulo 329-343.
- Cazenave, S.O.S., 2000. *Banisteriopsis caapi*: ação alucinógena e uso ritual. *Revista de Psiquiatria Clínica*, São Paulo, 27: 32-35.

- Cazarin, K.C.C., Corrêa, C.L., Zambrone, F.A.D., 2004. Redução, refinamento e substituição de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 40: 289-299.
- Cryan, J.F., Lucki, I., 2000. Antidepressant-Like Behavioral Effects Mediated by 5 hydroxytryptamine 2C Receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295: 1120-1126.
- Cryan, J.F., Markou, A., Lucki, J., 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences* 295: 1120-1126.
- Cryan, J.F., Slattery, D.A., 2012. Protocol: Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents 7: 1009-1014.
- Chahoud, I., Buschmann, J., Clark, R., Druga, A., Flake, H., Faqi, A., Hansen, E., Heinrich-Hirsch, B., Hellwig, J., Lingk, W., Parkinson, M., Paumgarten, F.J., Pfeil, R., Platzek, T., Scialli, A.R., Seed, J., Stahlmann, R., Ulbrich, B., Wu, X., Yasuda, M., Younes, M., Solecki, R., 1999. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Report on the second workshop on the terminology in developmental toxicology berlin. *Reproductive Toxicology* 13(1): 77-82.
- Costa, M.C.M., Figueiredo, M.C., Cazenave, S.O.S., 2005. Ayahuasca: Uma abordagem toxicológica do uso ritualístico. *Revista de Psiquiatria Clínica* 32 (6); 310-318.
- Convention on Psychotropic Substances, entry into force August (1971) 16, 1976, 1019 U.N.T.S. 175.
- Dawson, A.B., 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Stain Technology Journal*.
- Deliganis, A.V., Pierce, P.A., Peroutka, S.J., 1991. Differential interactions of dimethyltryptamine (DMT) with 5-HT1A and 5-HT2 receptors. *Biochemical Pharmacology*, 1.41 (11): 1739-44.
- De Souza, P.A., 2011. Revisão: Alcalóides e o chá de Ayahuasca: uma correlação dos “estados alterados da consciência” induzido por alucinógenos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 13 (3): 349-358.
- Desmarchelier, C., Gurni, A., Ciccio, G., Guilietti, A.M., 1996. Ritual and medicinal plants of the Ese'ejas of the Amazonian rainforest (Madre de Dios, Perú). *Journal Ethnopharmacology* 52 (1): 45-51.
- Fábregas, J.M., González, D., Fondevila, S., Cutchet, M., Fernández, X., Barbosa, P.C.R., Alcázar-Córcoles, M.A., Barbanoj, M.J., Riba, J., Bouso, J.C., 2010. Assessment of

- addiction severity among ritual users of ayahuasca. *Drug and Alcohol Dependence* 111 (3): 257-61.
- Figueroa, A.R.M., 2012. Avaliação dos efeitos neurotóxicos do chá de ayahuasca. Tese de doutorado, 119folhas. Programa de pós-graduação em toxicologia da Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto.
- Gable, R.S., 2007. Risk assessment of ritual use of oral dimethyltryptamine (DMT) and harmala alkaloids. *Addiction*. 102 (1):24-34.
- Glennon, R.A., Dukat, M., Wetkaemper, R.B., 2000. Serotonin receptor subtypes and ligands. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Disponível em: <http://www.acnp.org/G4/GN401000039/Ch039.html>
- Gatch, M.B., Rutledge, M.A., Carbonaro, T., Forster, M.J., 2009. Comparison of the discriminative stimulus effects of dimethyltryptamine with different classes of psychoactive compounds in rats. *Psychopharmacology* 204(4):715-24.
- Grella, B., Teitler, M., Smith, C., Herrick-Davis, K., Glennon, R.A., 2003. Binding of beta-Carbolines, 5-HT₂ Serotonin Receptors *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 4421-4425.
- Grob, C.S., McKenna, D.J., Callaway, J.C., Brito, G.S., Neves, E.S., Oberlaender, G., Saide, O.L., Labigaline, E., Tacla, C., Miranda, C.T., Strassman, R.J., Boone, K.B., 1996. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *Journal of Nervous and Mental Disease* 184: 86-94.
- Hale, F., 1935. The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. *American Journal of Ophthalmology*, 18: 1087-1093.
- Hall, C.S., 1934. Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 18, 385-403.
- Halpern, J.H., 2004. Hallucinogens and dissociative agents naturally growing in the United States. *Journal Pharmacology and Therapeutics* 102: 131-138.
- Handley, S.L, Mithani, S., 1984. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Archives of Pharmacology* 327: 1-5.
- Holmsted, B., Lindgren, J., 1967. Chemical constituents and pharmacology of South American snuffs, *Psychopharmacol Bull* 4 (3): 16.
- Katzung, B.G., 1998. *Farmacologia Básica e Clínica*, 6ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 204-6.

- Labete, B.C., Araújo, W.S., 2002. O uso ritual da Ayahuasca. Campinas: Mercado das Letras 322-330.
- Labete, B.C., 2004. A reinvenção do uso da ayahuasca nos centros urbanos. Campinas, São Paulo: Mercado de Letras, Fapesp 535.
- Labete, B.C., Feeney, B.C., 2012. Ayahuasca and the process of regulation in Brazil and internationally: implications and challenges. *Internacional Journal of Drug Policy* 23 (2): 154-61.
- Lima, L. M., Ferreira, M. S., Ávila, A. A., Perazzo, F. F., Schneedorf, J. M., Carvalho, J. C. T., 2006. Ayahuasca central nervous system effects: Behavioral study. *Arzt Zeitschrift fur Naturheilverfahren*.
- Lemonica, I.P., 2003. Embriofetotoxicidade. In: Oga S. *Fundamentos de Toxicologia*, 2 edição, São Paulo: Atheneu 91-99.
- Lucena, G. M., Porto, F.A, Campos, E.G., Azevedo, M.S., Cechinel-Filho, V., Prediger, R. D.S., Ferreira, V.M., 2010. Cipura paludosa attenuates long-term behavioral deficits in rats exposed to methylmercury during early development. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1150-1158.
- Luna, L.E., 2005. Narrativas da alteridade: a ayahuasca e o motivo de transformação em animal. In: Labete, B.C. & Goulart, S.L. *O uso ritual das plantas de poder*. Campinas, São Paulo: Mercado de Letras 333-354.
- Luna, L. E., 1986. Vegetalismo: shamanism among the mestizo population of the Peruvian Amazon. *Studies in Comparative Religion*. Almqvist and Wiksell International, Stockholm 202.
- MacRae, E., 2004. The ritual use of Ayahuasca by three brazilian religions. *Drug Use and Cultural Contexts, Beyond the West* Coomber 27-45.
- Mahmoudian, M., Hossein J. H., Salehian, P., 2002. Toxicity of peganumharmala: review and a case report. *Iran. Journal Pharmacology Therapeutics* 1: 1-4.
- Manel J., Barbano J., Riba, J., Clos, S., Giménez, S., Grasa, E., Romero, S., 2008. Daytime Ayahuasca administration modulates REM and slow-wave sleep in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 196 (2): 315-26.
- Manson, J.M., 1986. Teratogens. In Casarett and Doull's. *Toxicology the basic science of poisons*, 3 edition, New York.

- Miranda, E., 2003. Avaliação da segurança da administração do antimoniato de meglumina durante a gravidez. Dissertação de mestrado da Escola Nacional de Saúde Pública, FIOCRUZ-RJ.
- Miranda, E, Miekeley, N; De-Carvalho, R, Paumgartten, F., 2006. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. *Reproductive Toxicology* (Elmsford, N.Y.) 21: 292-300.
- Moore. K.L., Persaud, T.V.N., 2008. *Embriologia clínica*. Editora Elsevier, 8° edição.
- Moser, V., 2011. Functional assays for neurotoxicity testing. *Toxicologic Pathology* 39 (1): 36-45.
- Montgomery, K.C., 1955. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 48: 254-260.
- Moura, D.J., Richter, M.F., Boeira, J.M., Henriques, J.A.P., Saffi, J., 2007. Antioxidant properties of β -carboline alkaloids are related to their antimutagenic and antigenotoxic activities. *Mutagenesis* 22: 293-302.
- McKenna, D.J., TOWERS, G.H.N., 1985. On the comparative ethnopharmacology of malpighiaceae and myristicaceae hallucinogens. *Journal Psychoactive Drugs* 17(1):35-9.
- McKenna, D.J., Towers, G.H.N., Abbott, F., 1984. Monoamine oxidase inhibitors in South American hallucinogenic plants: tryptamine and betacarboline constituents of ayahuasca. *Journal of Ethnopharmacology* 10:195-223.
- McKenna, D.J., 2005. Ayahuasca and human destiny. *Journal Psychoactive Drugs* 37: 231-234.
- McKenna, D.J., Callaway, J.C., Grob, C.S., 1998. The scientific investigation of ayahuasca: A review of past and current research. *The Heffer Review os Psychedelic Research*.
- McKenna, D.J., 2004. Clinical investigations of the therapeutic potential of ayahuasca: rationale and regulatory challenges. *Pharmacology and Therapeutics* 102(2): 111-29.
- McIlhenny, E. H., Pipkin, K.E., Standish, L. J., Wechkin, H.A., Strassman, R., Barker, S.A., 2009. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine Ayahuasca by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1216(51): 8960-8.

- McIlhenny, E. H., Riba, J., Barbanoj, M.J., Strassman, R., Barker, S.A., 2011. Methodology for determining major constituents of ayahuasca and their metabolites in blood. *Biomedical Chromatography* 26(3): 301-13.
- Naranjo, P., 1986. El ayahuasca en la arqueologia ecuatoriana. *America Indígena* 46: 115-127.
- O'Connor, K.A., Roth, B.L., 2005. Screening the receptorome for plant-based psychoactive compounds. *Life Sciences* 506 – 511.
- OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. *Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Guideline: 423 http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf. Acesso em março de 2010.
- Oliveira, C.D., Moreira, C.Q., DE SÁ, L.R., Spinosa, H. S., Yonamine M., 2010. Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in *wistar* rats. *Birth Defects Research: part b developmental reproductive toxicology* 89(3): 207-12.
- Oliveira, C.D., Moreira, C.Q., Spinosa, H.S., Yonamine, M., 2011. Neurobehavioral, reflexological and physical development of *Wistar* rat offspring exposed to ayahuasca during pregnancy and lactation. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(6): 1065-1076.
- Petit-Demouliere, B., Chenu, F., Bourin, M., 2005. Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity. *Psychopharmacology* 177(3): 245-55.
- Pipkin, K.E., McIlhenny, E.H., Standish, L.J., Wechnkin, H.A., Strassman, R., Barker, S.A., 2009. Direct analysis of psychoactive tryptamine and harmala alkaloids in the Amazonian botanical medicine Ayahuasca by liquidchromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 8960–8968.
- Pires, A.P.S., Oliveira, C.D.R., Yonamine, M., 2010. Ayahuasca: uma revisão dos aspectos farmacológicos e toxicológicos. *Revista Ciências Farmacêuticas e Básica Aplicada* 31(1): 15-23.
- Portaria SVS/MS nº 344 da ANVISA [Ordinance SVS/MS n. 344 from the National Health Surveillance Agency]. (1998, May 12). Brasília.
- Pomilio, A.B., Vitale, A.A, Ollivier-Ciprian, J., Cetkovich-Bakmas, M., Gómez, R., Vázquez, G., 1999. Ayahoasca: an experimental psychosis that menors the transmethylation hypothesis of schizophrenia. *Journal Ethnopharmacology* 65(1): 29-51.

- Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M., 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal Pharmacology* 47(4): 379-91.
- Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal Pharmacology* 463: 3-33.
- Ramos, A., Pereira, E., Martins, G.C., Wehrmester, T.D., Izídio, G.S., 2008. Integrating the open field, elevated plus maze and light/dark box to assess different types of emotional behaviors in one single trial. *Behavioural Brain Research* 193(2): 277-88.
- Riba, J., Fornells, A.R., Urbano, G., Morte, A., Antonijuan, R., Montero, M., Callaway, J.C., 2001. Subjective effects and tolerability of the South American psychoactive beverage ayahuasca in healthy volunteers. *Psychopharmacology* 154:85-95.
- Riba, J., Valle, M., Urbano, G., Yritia, M., Morte, A., Barbanoj, M.J., 2003. Human pharmacology of ayahuasca: subjective and cardiovascular effects, monoamine metabolite excretion, and pharmacokinetics. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics* 306(1): 73-83.
- Rogers, J.M., Kavlock, R.J., 2001. Developmental toxicology, In Casarett and Doull's *Toxicology the basic science of poisons*, 6 edição, New York.
- Sachetti C.G., De Carvalho R.R., Paumgarten, F.J., Lameira, O.A., Caldas, E.D., 2011. Developmental toxicity of copaiba tree (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae) oleoresin in rat. *Food Chemical Toxicology* 45(9): 1080-5.
- Salewski, E., 1964. Farbmethode zum makroskopischen nachweis von implantationsstellen am uterus der ratte. *Naunyn-schmiedeberg s. Archiv Experimentelle Pathologie Pharmakologie* 281 367.
- Samoylenko, V., Rahman, M., Tekwani, B.L., Tripathi, L. M., Wang, H., Khan, S.I., Khan, I.A., Miller, L.S., Joshi, V.C., Muhammed, I., 2010. *Banisteriopsis caapi*, A unique combination of MAO inhibitory and antioxidative constituents for activities relevant of neurodegenerative disorders and parkinson's disease. *Journal Ethnopharmacology* 127(2): 357-67.
- Santos, R.G., 2004. Resenha: o uso ritual da ayahuasca. *Labirinto*, Universidade Federal de Rondônia.
- Santos, R.G., Fernandez, J.L., Strassman, R.J., Cruz, A.P.M., 2007. Effects of ayahuasca on psychometric measures of anxiety, panic-like and hopelessness in santo daime members. *Journal Ethnopharmacology* 112(3): 507-13.

- Santos, R.G., Moraes, C.C., Holanda, A., 2006. Ayahuasca e redução do uso abusivo de psicoativos: eficácia terapêutica? *Psicologia: Teoria e Pesquisa* 22: 363-370.
- Santos, R.G., 2010. Toxicity of chronic Ayahuasca administration to the pregnant rat: how relevant it is regarding the human, ritual use of ayahuasca? *Birth Defects Research* 89:533–535.
- Schultes, R.E., Hofmann, A., 1992. *Plants of the gods: their sacred, healing, and hallucinogenic powers*. 1ª edição Rochester, Vermont: Healing Arts Press.
- Schvartsman, S., 1992. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. 2ª edição São Paulo: Sarvier.
- Serrano-Dueñas, M., Cardozo-Pelaez, F., Sánchez-Ramos, J.R., 2001. Effects of *Banisteriopsis caapi* extract on Parkinson's disease. *The Scientific Review of Alternative Medicine* 5(3): 129-134.
- Shanon, B., 2003. Os conteúdos das visões da ayahuasca. *Mana* 6(2): 109-152.
- Silva, L.O., 2004. Estudo sobre o castigo simbólico, ou peia, do culto do Santo Daime. Dissertação de mestrado em ciências da religião, PUC/SP.
- Smith, R.L., Canton, H., Barret, R. J., Sanders-Bush, E., 1998. Agonist properties of N, N-dimethyltryptamine at 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} serotonin receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 61 (3): 323-330.
- Steiner, T., 2011. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. *Translational Research* 13(4): 495-506.
- Sterz, H., 1977. Routine examination of rat and rabbit fetuses for malformations of internal organs, combination of barrow and Wilson methods. In *Methods in Prenatal Toxicology* 113-122.
- Strassman, R.J., Qualls, C.R., Uhlenhuth, E.H., Kellner, E., 1994. Dose-response study of N, N-dimethyltryptamine in humans. II. Subjective effects and preliminary results of a new rating scale. *Archives of General Psychiatry* 51(2): 98-108.
- Taiwo, A. E., Lucena, G. M., Silveira, D., Leite, F. B., Barros, M., Silva, M. V., Ferreira, V.M., 2012. Anxiolytic and antidepressant-like effects of *Melissa officinalis* (lemon balm) extract in rats: influence of administration and gender. *Indian Journal of Pharmacology*, 44: 189-192.
- Tupper, K.W., 2002. Entheogens and existential intelligence: The use of plant teachers as cognitive tools. *Canadian Journal of Education* 27(4):499-516.

- Tupper, K.W., 2008. The globalization of Ayahuasca: harm reduction or benefit maximization? *International Journal of Drugs Policy* 19(4): 297-303.
- Valadares, M.C., 2006. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a era do teste DL₅₀. *Revista Eletrônica de Farmácia* 3(2): 93-98.
- Vinha, F.C.G., 2005. Ayahuasca: a sacralidade da floresta e a consciência ecológica. *Dissertação de mestrado em engenharia florestal, UnB/DF.*
- Wang, Y.H., Samoylenko, V., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Miller, L.S., Chaurasiya, N.D., Rahman, M., Tripathi, L.M., Khan, S.I., Joshi, V.C., Wigger, F.T., Muhammad, I., 2010. Composition standardization and chemical profiling of *Banisteriopsis caapi* a plant for the treatment of neurodegenerative disorders relevant to parkinson's disease. *Journal Ethnopharmacology* 128(3): 662-71.