

## Avaliação de eficácia do constituinte da própolis verde artepelin C em testes experimentais de ansiedade

**Autores:** Larissa Daniela da Cunha<sup>1</sup>, Priscila Freitas-Lima<sup>2</sup>

**Colaboradores:** Laíse Aparecida dos Santos<sup>3</sup>, Maria Adrielle Vicente<sup>4</sup>

<sup>1,2,3</sup>Centro Universitário Barão de Mauá

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo

<sup>1</sup>larissa.medicina19@gmail.com - Medicina, <sup>2</sup>priscila.freitas@baraodemaua.br

### Resumo

A ansiedade é uma condição amplamente incidente, e seu tratamento farmacológico por vezes é limitado ante a ocorrência de irresponsabilidade, toxicidade e tolerância. O presente estudo avaliou três doses de artepelin C, um isolado da própolis verde, quanto aos seus potenciais efeitos ansiolíticos em camundongos. De acordo com os dados analisados é possível concluir que o artepelin C, não apresentou efeitos ansiolíticos estatisticamente significativos.

### Introdução

A ansiedade patológica é descrita como uma condição psiquiátrica heterogênea qualificada pela presença de excitabilidade aumentada (*hyperarousal*), medo e preocupação excessivos (OLTHUIS et al., 2016). Segundo a American Psychiatric Association (2014), os distúrbios de ansiedade abarcam diversificadas manifestações, as quais incluem transtorno de ansiedade generalizada, transtorno obsessivo-compulsivo, transtorno do pânico, fobia social, dentre outras. A epidemiologia dos transtornos de ansiedade enfatiza sua importância: estima-se que as taxas de prevalência variam globalmente entre 3,8 e 25% (REMES et al., 2016).

O ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (SNC), associa-se ao processo neurobiológico subjacente à ansiedade, dado que está implicado no controle da excitação e do medo (KONKIEWITZ et al., 2010). De fato, parte do tratamento farmacológico da ansiedade (especialmente em casos agudos) pauta-se na utilização de uma classe terapêutica denominada benzodiazepínicos, os quais caracterizam-se como importantes agonistas alostéricos do receptor GABA<sub>A</sub> (O'DONNELL; SHELTON, 2012). Representantes benzodiazepínicos incluem o diazepam (DZP), clonazepam, lorezepam,

bromazepam, dentre outros. Adicionalmente, os transtornos de ansiedade podem ser farmacologicamente tratados com alguns antidepressivos (sobretudo pelo fato de ambas as condições serem geralmente comórbidas), antagonistas  $\beta$ -adrenérgicos e buspirona, com escolha a depender de efeitos adversos, interações e eventual necessidade crônica ou aguda (O'DONNELL; SHELTON, 2012). Não obstante, as taxas de resposta a tais tratamentos não ultrapassam cerca de 66% (DE VRIES et al., 2016) enfatizando a necessidade de crescente investimento em alternativas terapêuticas para se evitar os frequentes abandonos de tratamento, recaídas, recorrências e piora de prognóstico observáveis neste cenário.

A própolis, mistura resinosa que se origina de diferentes fontes botânicas, é produzida pelas abelhas com o intuito de construir e proteger a colmeia. Este produto de origem natural apresenta inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas, tais como atividades antitumoral, anti-inflamatória, antibacteriana e, principalmente, antioxidante (LUSTOSA et al., 2008). Diferentes tipos de própolis são encontrados em território brasileiro, as quais podem ser classificadas em doze grupos distintos, conforme critérios de similaridade físico-químicos. Dentre os diversos tipos está a própolis verde, oriunda da espécie *Baccharis dracunculifolia* (alecrim do campo), planta nativa brasileira, amplamente distribuída em São Paulo e Minas Gerais (PARK et al., 2004). A própolis verde apresenta uma composição fenólica específica que inclui o artepelin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (LUSTOSA et al., 2008).

Atividades ansiolíticas e antidepressivas têm sido demonstradas experimentalmente para o extrato etanólico de própolis (LI et al., 2012; LEE et al., 2013; REIS et al., 2014; FILHO et al., 2016). De acordo com Li e colaboradores (2012), o óleo essencial da própolis, além de antagonizar a hiperfunção do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

evidenciada nos quadros de ansiedade, possui ação antioxidante no tecido cerebral. Tais autores demonstraram haver reversão do comportamento ansioso em camundongos previamente submetidos a estresse sem que houvesse efeito sobre a atividade locomotora desses animais. No entanto, não há descrições de atividades biológicas empregando testes neurocomportamentais especificamente com componentes isolados da própolis verde, como é o caso do artepilin C.

## Objetivo

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o potencial ansiolítico do composto artepilin C em camundongos submetidos a testes de ansiedade.

## Materiais e Métodos

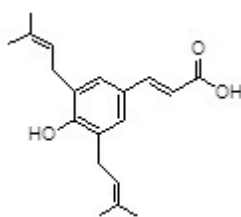
### Tipo de estudo

A presente proposta se caracteriza como *estudo experimental*.

### Artepilin C

O composto artepilin C (Figura 1) aplicado no presente estudo foi obtido através de extratos hidroalcoólicos de amostras de própolis verde fornecidos pela empresa Apis Flora Indl. Coml. Ltda. Os extratos foram submetidos a solubilizações e partições para o isolamento da substância de interesse, cuja pureza foi atestada por técnicas cromatográficas. Todas as etapas analíticas foram conduzidas pela Profa Dra Vanessa Leiria Campo e equipe, numa parceria entre o Centro Universitário Barão de Mauá e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Figura 1 – Estrutura química do artepilin C



Fonte: elaborado pelo autor.

Para administração aos animais, os extratos de artepilin C obtidos foram diluídos em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 0,05% em água destilada resultando na obtenção das três doses de teste: 1mg/kg, 3 mg/kg e 10 mg/kg.

### População e amostra

Foram utilizados 46 camundongos da linhagem Swiss, exclusivamente machos, adultos jovens

(peso aproximado de 30 gramas), criados e mantidos pelo biotério do Centro Universitário Barão de Mauá. Os animais (cinco por caixa) eram mantidos em temperatura padronizada (24-25°C), com ciclo claro-escuro de 12h e acesso irrestrito a água e alimento.

### Aspectos éticos

Os experimentos foram conduzidos de acordo com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal do Centro Universitário Barão de Mauá (Processo 394/20).

### Testes comportamentais

A pesquisa neurocomportamental há muito utiliza-se de modelos animais para as mais variadas investigações, as quais incluem testagens de potenciais terapêuticos de novos compostos. Parte-se da premissa que modelos experimentais reproduzem as características dos quadros patológicos sob investigação; contudo, a literatura reconhece que ante a complexidade dos distúrbios psiquiátricos, esta reprodutibilidade é limitada e deve ser melhor compreendida como uma representação geral do quadro resultante do desenvolvimento de modelos ou da condução de testes comportamentais validados (LISTER, 1990).

O paradigma claro-escuro é baseado em uma situação de conflito, sem que haja a presença de um estímulo punitivo. O conflito se dá entre a tendência natural dos animais a explorar e a tendência inicial de se esquivar do que não é familiar. O comportamento aversivo dos animais é produzido neste modelo pela novidade do ambiente e a iluminação. O aparato do teste da transição claro-escuro constitui-se de uma caixa contendo dois compartimentos, um escuro e um iluminado (claro), com dimensões aproximadas de 220 x 223 x 220 (mm), interligados por uma abertura divisória, tendo sido inicialmente desenvolvido para avaliar os efeitos ansiolíticos de drogas benzodiazepínicas (CALATAYUD et al., 2004; TAKAO; MIYAKAWA, 2006).

O teste do labirinto em cruz elevado pauta-se na esquivas natural do roedor de lugares altos, iluminados e desprotegidos, sendo um teste amplamente empregado para avaliação de ansiedade (LISTER, 1987). Utiliza-se um aparato elevado acima do nível do chão composto por dois braços fechados opostos perpendicularmente a dois braços abertos. O animal é colocado no centro do aparelho com a cabeça voltada para um dos braços fechados e o seu comportamento é observado por 5 min (PELLOW et al., 1985). A medida comportamental clássica registrada neste teste é a exploração dos braços abertos (entradas e o tempo gasto). Um aumento seletivo nos parâmetros correspondentes aos braços abertos

revela um efeito tipo ansiolítico (PELLOW et al., 1985).

O teste de arena (também conhecido como campo aberto) apresenta validade para mensurações de ansiedade e mobilidade em modelos de roedores. É utilizada uma arena circular com marcações de quadrantes em seu fundo, e para a realização do teste o animal é posicionado no centro da arena. Tempo maior de permanência no centro do campo aberto e aumento na atividade de defecação indicam ansiedade (CRUZ; LANDEIRA-FERNANDEZ, 2012). O tempo de observação é de 5 minutos. Este teste também fornece informações sobre a capacidade locomotora do animal.

### Coleta de dados

O benzodiazepínico DZP foi escolhido como fármaco controle na dose classicamente adotada na literatura para efeitos ansiolíticos em camundongos (1 mg/kg). A via de administração adotada para todos os animais foi a gavagem (via oral), com dose de 300 µL sempre utilizando como veículo a solução de DMSO a 0,05% em água destilada. Todo o protocolo foi feito de forma aguda.

Os animais (n=46) foram alocados em grupos conforme detalhado a seguir, baseado em achados da literatura que reforçam o mínimo necessário para poder estatístico em testes farmacológicos:

GRUPO VEÍCULO (n=14);  
GRUPO DIAZEPAM (n=11);  
GRUPO A1 (n=7): artepilin C 1mg/kg;  
GRUPO A2 (n=7): artepilin C 3mg/kg;  
GRUPO A3 (n=7): artepilin C 10mg/kg.

Os testes comportamentais foram conduzidos no biotério do Centro Universitário Barão de Mauá.

Meia hora antes do início dos experimentos os animais eram conduzidos à sala de testes para aclimação e habituação. Foram mantidas condições ideais para realização dos experimentos: atenuação dos níveis de ruído, baixa intensidade de iluminação e temperatura controlada (24-25°C). Após esse período, era feita a administração de algum dos compostos conforme supramencionado. O animal era então colocado individualmente em uma caixa, onde aguardava por mais 30 minutos até início das testagens. Após este período o animal dava início ao *screnning* comportamental, ou seja, todos os animais, independentemente do tratamento, passavam por todos os aparatos de teste (5 minutos em cada), na seguinte ordem: caixa claro-escuro, labirinto em cruz elevado e arena. Concluído o *screnning*, o animal permanecia na sala de testes por mais 30 minutos, sendo posteriormente levado a uma outra sala para finalização (indução de morte). No período entre a experimentação com cada animal os aparatos dos

testes comportamentais eram devidamente higienizados com álcool etílico 10% e secos em ar corrente.

O óbito dos camundongos era induzido através de sobrecarga anestésica por via intraperitoneal (associação de xilazina 20mg/kg + ketamina 270mg/kg para indução + o barbitúrico tiopental 120mg/kg). Evidenciado o aprofundamento anestésico, era realizada a coleta de sangue do animal através de plexo orbital (as amostras de soro encontram-se congeladas para eventuais análises futuras).

### Análise dos dados

Todos os experimentos foram gravados. Para a análise dos vídeos foi utilizado o *software* AnyMaze®. De acordo com o parâmetro de interesse obtido a partir de cada teste foi então realizada a análise estatística pela ANOVA de uma via no *software* GraphPad Prism 8®.

### Resultados e discussão

Reconhece-se que a ansiedade demanda pronto e inequívoco diagnóstico, assim como apropriado tratamento, não apenas pelos prejuízos que causa diretamente aos pacientes, mas também em virtude das outras condições clínicas às quais os indivíduos acometidos passam a apresentar maior predisposição (BATELAAN et al., 2016). Tratar adequadamente os pacientes que não respondem satisfatoriamente às intervenções disponíveis é, sem dúvidas, um grande desafio. A pesquisa de novos medicamentos com efeito ansiolítico para pacientes que apresentam transtorno de ansiedade farmacorresistente aos agentes tradicionais mostra-se desafiadora, porém emergente diante de uma patologia tão limitante e incidente. Desta forma, modelos e testes animais se apresentam como importantes ferramentas para investigar possíveis alvos terapêuticos (ABELAIRA et al., 2013).

As propriedades intrínsecas à própolis, tais como sua capacidade anti-inflamatória e antioxidante, são alvo de pesquisas há algum tempo (LI et al., 2012; BHARGAVA et al., 2021; ZULHENDRI; PERERA; TANDEAN, 2021). Porém, o enfoque das aplicações de tais propriedades no estudo de transtornos ansiosos ainda carece de aprofundamento, particularmente no que diz respeito a análises envolvendo compostos isolados da própolis. Objetivando contribuir com a lacuna de conhecimento neste âmbito, o presente estudo elegeu o artepilin C como composto de interesse ante seus potenciais biológicos diversos já descritos *in vitro* e *in vivo* (BESERRA et al., 2020; SHAHINOZZAMAN et al., 2020). As doses selecionadas para testagem são as experimentalmente aplicadas quando não há descrições prévias norteadoras na literatura.

Ademais, a escolha do veículo (DMSO 0,05% em água destilada para administração oral) constituiu-se um diferencial importante do trabalho, dado que estudos prévios se utilizaram em sua maioria de extratos em solução hidroalcoólica, o que pode exercer influências sobre o comportamento e habilidades motoras dos animais (SMOOTHY; BERRY, 1984).

O teste da caixa claro-escuro (Figura 2) ao qual todos os animais foram sujeitos teve como principal parâmetro gerado a porcentagem de tempo permanecido no lado claro, o que é indicativo de redução dos níveis de ansiedade.

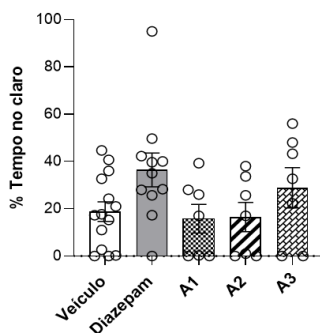
**Figura 2 – Teste da caixa claro-escuro**



Fonte: acervo do autor.

De acordo com os resultados da ANOVA de uma via, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados no que diz respeito à porcentagem de tempo em que o animal permaneceu no lado claro da caixa (ANOVA de uma via:  $F(4, 41)=2,144$ ;  $p=0,09$ ). No gráfico (Figura 3) a representação é de média e erro padrão da média.

**Figura 3 – Resultados do teste da caixa claro-escuro**



Fonte: elaborado pelo autor.

Imediatamente após a retirada do animal da caixa-escuro, o animal era colocado no centro do aparato labirinto em cruz elevado (Figura 4), local onde permanecia por mais 5 minutos.

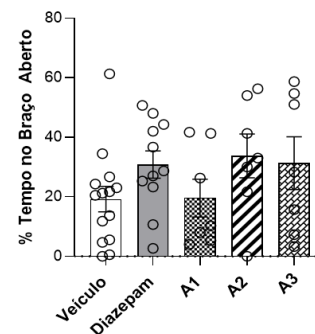
**Figura 4 – Labirinto em cruz elevado**



Fonte: acervo do autor.

Conforme os resultados da ANOVA de uma via, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados no que diz respeito à porcentagem de tempo em que o animal permaneceu no braço aberto (ANOVA de uma via:  $F(4, 41)=1,433$ ;  $p=0,24$ ). No gráfico (Figura 5) a representação é de média e erro padrão da média.

**Figura 5 – Resultados do teste labirinto em cruz elevado**



Fonte: elaborado pelo autor.

Na sequência, os animais passavam para a arena (Figura 6), onde permaneciam por mais 5 minutos movimentando-se sem qualquer tipo de restrição.

**Figura 6 - Arena**



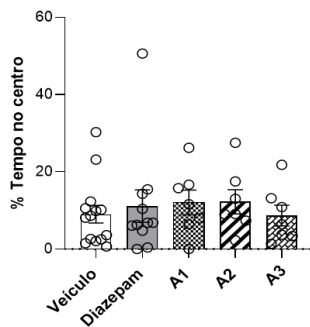
Fonte: acervo do autor.

De acordo com os resultados da ANOVA de uma via, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos analisados no que diz respeito à porcentagem de tempo em que o animal permaneceu no centro da arena (ANOVA de uma via:  $F(4, 41)=0,2456$ ;  $p=0,9107$ ). No gráfico



(Figura 7) a representação é de média e erro padrão da média.

**Figura 7 – Resultados da arena**



Fonte: elaborado pelo autor.

Congruente com as análises conduzidas, não foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas entre as doses de artepilin C e o veículo ou o controle (DZP) nas condições experimentais adotadas. No que diz respeito às esperadas diferenças entre veículo e DZP quanto às atividades ansiolíticas deste, algumas particularidades devem ser consideradas. Embora o DZP, dadas as suas propriedades ansiolíticas e hipnóticas, ainda seja o fármaco controle mais amplamente utilizado em experimentos envolvendo ansiedade, há uma marcada diferença na sensibilidade dos animais à exposição a este benzodiazepínico (WONG; YOONG; GWEE; 1986; YOONG et al., 1986), o que pode ocorrer em doses baixas, como a adotada, e inclusive ante a exposição aguda, como o caso do presente estudo. Desta forma, não devemos desconsiderar que tal sensibilidade possa, em alguma extensão, justificar a ausência de diferença estatisticamente significativa entre os animais controle e os animais aos quais apenas o veículo foi administrado.

Ao compararmos as doses de artepilin C ao controle, a ausência de diferença estatisticamente significativa na atividade ansiolítica não corrobora o achado prévio de Reis e colaboradores (2014), os quais apontam haver atividade ansiolítica, estimulante e antidepressiva em ratos tratados com extrato oleoso de própolis por via intraperitoneal. Adicionalmente às diferenças entre espécies e vias de administração utilizadas pelos autores e pelo presente estudo, nossos dados podem sugerir que eventuais efeitos reais da própolis sobre manifestações depressivas e ansiosas não se devem especificamente ao artepilin C, mas sim a algum dos outros incontáveis compostos biologicamente ativos que compõem o extrato de própolis.

Não obstante, a verificação da existência de um agente de origem natural que, mesmo não se

mostrando superior ao DZP quanto às suas atividades ansiolíticas, não é também estatisticamente inferior a ele, abre-nos a possibilidade de investigações futuras promissoras. Conforme consubstanciado por O'Donnell e Shelton (2012), os benzodiazepínicos são fármacos amplamente utilizados em todo o mundo, com robusta eficácia ansiolítica. Contudo, muitos pacientes não podem fazer uso desta classe terapêutica especialmente ante aos efeitos adversos que lhe são atribuídos, em especial, o efeito sedativo. Adicionalmente, o uso dos benzodiazepínicos encontra no potencial à tolerância uma importante barreira ao seu uso, sobretudo o crônico. Assim, a despeito das limitações do presente estudo e da ausência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos analisados no delineamento proposto, a busca por alternativas terapêuticas que apresentem efetividade maior ou equivalente aos fármacos já estabelecidos, porém com possível menor toxicidade, apresenta-se como um campo de pesquisas amplo e urgente. Os compostos naturais, portanto, surgem como uma promissora aposta para o desenvolvimento de terapias coadjuvantes no tratamento da ansiedade, ou para pacientes que não toleram as reações adversas de fármacos como os benzodiazepínicos.

## Conclusão

De acordo com os dados analisados é possível concluir que o artepilin C, composto extraído da própolis verde, não apresentou efeitos ansiolíticos estatisticamente significativos em camundongos sob uso agudo por via oral. Contudo, compostos naturais podem ser opções promissoras para o uso adjuvante ou alternativo no tratamento da ansiedade, uma vez que suas equivalências nos efeitos ansiolíticos comparativamente a controles robustos (como o DZP) podem representar uma opção a indivíduos que sofrem com a irresponsabilidade, toxicidade ou tolerância a benzodiazepínicos.

## Referências

- ABELAIRA, H. M.; RÉUS, G. Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. **Rev Bras Psiquiatr.**, v. 35, n. 2, p. 112-120, 2013.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5.** 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- BATELAAN, N. M.; SELDENRIJK, A.; BOT, M.; VAN BALKOM, A. J. L. M.; PENNINX, B. W. J. H. Anxiety and new onset of cardiovascular disease: critical review and meta-analysis. **Br J Psychiatry**, v. 208, p. 223-231, 2016.

BESERRA, F. P.; GUSHIKEN, L. F. S.; HUSSNI, M. F.; et al. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: A review on pharmacological aspects. **Phytother Res**, v. 35, n. 5, p. 2274-2286, 2020.

BHARGAVA, P.; MAHANTA, D.; KAUL, A.; ISHIDA, Y.; TERAOKA, K.; WADHWANI, R.; KAUL, S. C. Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. **Nutrients**, v. 13, p. 2528-2551, 2021.

CALATAYUD, F.; BELZUNG, C.; AUBERT, A. Ethological validation and the assessment of anxiety-like behaviours: methodological comparison of classical analyses and structural approaches. **Behav Processes**, v. 30, n. 67, p. 195-206, 2004.

CRUZ, A. P. M.; E LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. In: J. landeira-Fernandez e Sérgio Fukusima (org), **Métodos em Neurociência**. São Paulo: Manole, 2012, p. 192-217.

DE VRIES, Y. A.; DE JONGE, P., VAN DEN HEUVEL, E.; TURNER, E. H.; ROEST, A. M. Influence of baseline severity on antidepressant efficacy for anxiety disorders: meta-analysis and meta-regression. **Br J Psychiatry**, v. 208, p. 515-521, 2016.

FILHO, C. B.; JESSE, C. R.; DONATO, F.; DEL FABBRO, L.; DE GOMES, M. G.; GOES, A. T. R.; SOUZA, L. C.; GIACOMELI, R.; ANTUNES, M.; LUCHESE, C.; ROMAN, S. S.; BOEIRA, S. P. Neurochemical factors associated with the antidepressant-like effect of flavonoid chrysin in chronically stressed mice. **Eur J. Pharmacol.**, v. 791, p. 284-296, 2016.

KONKIEWITZ, E. C. **Tópicos de Neurociência Clínica**. Dourados: EdUFGD, 2010.

LEE, M.; KIM, Y. H.; PARK, W.; AHN, W. G.; PARK, O. K.; KWON, S.; MORITA, K.; SHIM, I.; HER, S. Novel antidepressant-like activity of propolis extract mediated by enhanced glucocorticoid receptor function in the hippocampus. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/217853/>. Acesso em: 05 mar. 2022.

LI, Y-J; XUAN, H-Z; SHOU, Q-Y; ZHAN, Z-G; LU, X; HU, F-L. Therapeutic effects of propolis essential oil on anxiety of restraint-stressed mice.

**Human and Experimental Toxicology**, v. 31, p. 157-165, 2012.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 92, p. 180-5, 1987.

LISTER, R. G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacol Ther.**, v. 46, p. 321-40, 1990.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; NETO, P. J. R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 447-454, 2008.

O'DONNELL, J. M.; SHELTON, R. C. Tratamento farmacológico da depressão e dos transtornos de ansiedade. In: BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (org). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012, p. 397-415.

OLTHUIS, J. V.; WATT, M. C.; BAILEY, K.; HAYDEN, J. A.; STEWART, S. H. Therapist supported Internet cognitive behavioural therapy for anxiety disorders in adults. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 3, CD011565, 2016.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PELLOW, S; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-16, 1985.

REIS, J. S. S.; OLIVEIRA, G. B.; MONTEIRO, M. C.; MACHADO, C. S.; TORRES, Y. R.; PREDIGER, R. D.; MAIA, C. S. F. Antidepressant and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1466-1472, 2014.

REMES, O.; BRAYNE, C.; VAN DER LINDE, R.; LAFORTUNE L. A systematic review of reviews on the prevalence of anxiety disorders in adult populations. **Brain Behav.**, v. 6, e00497, 2016.

SHAHINOZZAMAN, M.; BASAK, B.; RASHIDUZZAMAN, E.; ROZARIO, P.; OBANDA, D. N. Artepillin C: A comprehensive review of its

chemistry, bioavailability, and pharmacological properties. **Fitoterapia**, v. 147, 2020.

SMOOTHY, R.; BERRY, M. S. Alcohol increases both locomotion and immobility in mice: an ethological analysis of spontaneous motor activity. **Psychopharmacology**, v. 83, n. 3, p. 272-6, 1984.

TAKAO, K.; MIYAKAWA, T. Light/dark transition test for mice. **J. Vis Exp.**, e104, p. 1-3, 2006.

WONG, P. T.; YOONG, Y. L.; GWEE, M. C. Marked variation in diazepam sensitivity in Swiss albino mice. **Life Sci**, v. 39, n. 11, p. 945-52, 1986.

YOONG, Y. L.; LEE, H. S.; GWEE, M. C.; WONG, P. T. Acute tolerance to diazepam in mice: pharmacokinetic considerations. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 13, n. 2, p. 153-8, 1986.

ZULHENDRI, F.; PERERA, C. O.; TANDEAN, S. Can Propolis Be a Useful Adjuvant in Brain and Neurological Disorders and Injuries? A Systematic Scoping Review of the Latest Experimental Evidence. **Biomedicines**, v. 9, p. 55-62, 2021.