



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E NO ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS TRATADOS COM EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS AMARELA**

Cynthia Cristina Sousa de Menezes da Silveira

BELÉM – PA
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E NO ESTRESSE
OXIDATIVO EM RATOS TRATADOS COM EXTRATO
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS AMARELA**

Cinthia Cristina Sousa de Menezes da Silveira

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane do Socorro Ferraz Maia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA
2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cinthia Cristina Sousa de Menezes da Silveira

Efeitos Neurocomportamentais e no Estresse oxidativo em ratos tratados com Extrato Etanólico de Própolis Amarela

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora

Profª Drª Cristiane do Socorro Ferraz Maia (UFPA)

Banca examinadora:

Profª Drª Marta Chagas Monteiro (UFPA)

Profª Drª Luana Melo Diogo de Queiroz (UFPA)

Dedico este trabalho aos meus filhos João Gabriel e João Gustavo, ao meu marido Alex, a minha mãe e meu pai, pelo apoio, compreensão e incentivo, e a minha orientadora Prof^a Dr^a Cristiane Maia que não me deixou desistir.

Cinthia Silveira

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Ao meu marido pelo amor, carinho, compreensão, constante apoio e incentivo nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais que não mediram esforços para tornar possível meu sonho.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Cristiane Maia pela atenção, paciência, amizade, confiança, apoio e orientação durante todo o trabalho, mas principalmente pelo exemplo de ser humano que nos faz querer seguir seus passos.

À família LAFICO, em especial à querida amiga Luanna Fernandes por toda ajuda e amizade.

À Prof^a Dr^a Marta Chagas por ter cedido as instalações e infra-estrutura de seu laboratório para realização dos testes de bioquímica oxidativa e importante colaboração para o desenvolvimento da dissertação.

À Prof^a Dr^a Yohandra Reyes Torres da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO) pela amostra de própolis cedida.

Ao Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA, pelo fornecimento dos animais.

À Universidade Federal do Pará e Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela equipe de pesquisadores, laboratórios e oportunidade oferecida de realizar o Mestrado.

À Fundação Santa Casa de Misericórdia do Pará, que possibilitou a minha presença no curso de Mestrado por meio de licença para estudo.

“As tarefas que nos propomos, devem conter exigências que pareçam ir além de nossas forças. Caso contrário, não descobrimos nosso poder, nem conhecemos nossas energias escondidas e assim deixamos de crescer.”

Leonardo Boff

RESUMO

EFEITOS NEUROCOMPORTAMENTAIS E NO ESTRESSE OXIDATIVO EM RATOS TRATADOS COM EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS AMARELA

A própolis é um material resinoso elaborado pelas abelhas que coletam matéria-prima de diversas partes de plantas, transformando-as pela adição de secreções salivares e cera. No Brasil, 13 tipos de própolis foram quimicamente caracterizados. Na própolis amarela do Mato Grosso do Sul foram identificados 15 compostos, todos pertencentes à classe dos triterpenos, e baixos teores de compostos fenólicos e flavonóides. Este trabalho tem como objetivo realizar ensaios comportamentais e bioquímicos com administração aguda de extrato etanólico de própolis amarela. Foram utilizados 8 grupos de ratos machos Wistar, 3 meses (n = 10 por grupo), divididos em controle (Tween 5%), controle positivo para atividade ansiolítica (diazepam), controle positivo para atividade antidepressiva (fluoxetina), controle positivo para efeito mnemônico (cafeína), 4 doses do extrato (1, 3, 10, 30mg/Kg). A administração do extrato foi realizada de forma aguda, via intraperitoneal. Os testes comportamentais utilizados foram campo aberto, labirinto em cruz elevado, nado forçado e esquiva inibitória. Após os testes comportamentais foi realizada a coleta de sangue na região intracárdica dos ratos, para determinação de óxido nítrico, malondialdeído, catalase, superóxido desmutase e capacidade antioxidante total. Os resultados obtidos no teste do campo aberto demonstraram locomoção espontânea preservada e atividade do tipo ansiolítica, resultado confirmado com o teste do labirinto em cruz elevado. No teste do nado forçado, o extrato etanólico de própolis amarela demonstrou ação do tipo antidepressiva. No teste da esquiva inibitória apresentou atividade mnemônica na dose de 30mg/Kg. Na avaliação da bioquímica oxidativa, o extrato reduziu a produção de óxido nítrico e malondialdeído, sem alterar o nível de antioxidantes totais, catalase e superóxido desmutase, induzidos pelo estresse. Com estes resultados conclui-se que o extrato etanólico de própolis amarela possui atividade ansiolítica, antidepressiva, mnemônica e antioxidante.

Palavras-chave: própolis, ansiedade, depressão, memória, estresse oxidativo.

ABSTRACT

NEUROBEHAVIORAL EFFECTS AND OXIDATIVE STRESS IN RATS TREATED WITH YELLOW PROPOLIS ETHANOLIC EXTRACT

Propolis is a resinous substance produced by bees that collect raw material from different parts of plants, through the addition of salivary secretions and wax. In Brazil, 13 types of propolis were chemically characterized. In the yellow propolis of Mato Grosso do Sul were identified 15 compounds, all belonging to the class of triterpenoids, and low levels of phenolic compounds and flavonoids. This work aims to conduct behavioral and biochemical assays with acute administration of yellow propolis ethanolic extract. 8 groups of male Wistar rats, 3 months, were used (n = 10 per group) and were divided into control (Tween 5%), positive control for anxiolytic activity (diazepam), positive control for antidepressant activity (fluoxetine), positive control for mnemonic effect (caffeine), 4 doses of the extract (1, 3, 10, 30mg/kg). The extract administration was performed acutely, intraperitoneally. Behavioral tests were open field, elevated plus maze, forced swimming and inhibitory avoidance. After the behavioral testing was performed to collect blood in the intracardiac area of the animals for determination of nitric oxide, malondialdehyde, catalase, superoxide dismutase and total antioxidant capacity. The results obtained in the open field test showed spontaneous locomotion preserved and anxiolytic-like activity, confirmed result with the elevated plus maze. In the forced swimming test, the yellow propolis ethanolic extract demonstrated action of antidepressant-like. In the inhibitory avoidance test showed mnemonic activity at 30 mg/kg. In the evaluation of oxidative biochemistry, the extract reduced the production of nitric oxide and malondialdehyde without changing level of total antioxidant, catalase and superoxide dismutase, induced by stress. With these results it is concluded that the yellow propolis ethanolic extract has anxiolytic, antidepressant, mnemonic and antioxidant activity.

Keywords: propolis, anxiety, depression, memory, oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Própolis bruta.....	19
Figura 02	Extratos etanólicos dos 12 grupos de própolis brasileira.....	21
Figura 03	Estrutura química do mirtenol, alfa-terpineol, 1-trans-pinocarveol, verbenona, viridiflorol, spatulenol, (+)-aromadendreno.....	24
Figura 04	Estrutura química do β -cariofileno, δ -cadineno.....	25
Figura 05	Estrutura química do lupeol e β -amirina.....	26
Figura 06	Estruturas cerebrais envolvidas na fisiopatologia da ansiedade.	31
Figura 07	Receptor GABA _A	32
Figura 08	Mecanismo de atividade serotoninérgica.....	33
Figura 09	Fisiopatologia da depressão.....	35
Figura 10	Interação de glutamato com receptores NMDA.....	36
Figura 11	As áreas do cérebro envolvidas na memória e suas respectivas conexões.....	38
Figura 12	Vias de formação de EROs, o processo de peroxidação lipídica e o papel da GSH e outros antioxidantes no controle do processo oxidativo.....	45
Figura 13	Esquema ilustrativo do tratamento e avaliação comportamental com EEPA.....	53
Figura 14	Diagrama esquemático do aparato utilizado no teste do campo aberto.....	55
Figura 15	Diagrama esquemático de um aparelho de Labirinto em Cruz Elevado.....	57
Figura 16	Diagrama esquemático de um aparelho de Nado Forçado.....	60
Figura 17	Aparelho de Esquina Inibitória.....	62
Figura 18	Efeito do tratamento EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) na locomoção total em metros, no teste do campo aberto.....	69
Figura 19	Efeito do tratamento EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) na locomoção central em metros e tempo na área central em segundos, no teste do campo aberto.....	70
Figura 20	Efeito do tratamento EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) no %EBA e %TBA, no LCE.....	71
Figura 21	Efeito do tratamento EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) no EBF, no LCE.....	72
Figura 22	Efeito do tratamento EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) no tempo de imobilidade e tempo de nado em segundos, no teste do nado forçado.....	73
Figura 23	Efeito do tratamento EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) no parâmetro tempo de descida em segundos, no teste da esquiiva inibitória..	74
Figura 24	Concentração de NO nos grupos tratados com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg), grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em $\mu\text{mol/L}$	75

Figura 25	Determinação de MDA nos grupos tratados com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg), grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em nmol/mL.....	76
Figura 26	Dosagem de TEAC nos grupos tratados com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg), grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em μ mol/L.....	77
Figura 27	Determinação da atividade da CAT nos grupos tratados com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg), grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em U/mg proteína.....	78
Figura 28	Determinação da atividade da SOD nos grupos tratados com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg), grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em nmol/mL.....	79
Quadro 01	Classificação da própolis brasileira.....	22
Quadro 02	Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE nos 12 grupos de própolis brasileira.....	23
Quadro 03	Valores dos teores médios de fenólicos e flavonóides obtidos para os 6 extratos de própolis.....	25
Quadro 04	Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS ⁺ •	Radical 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]
ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ALA	Ácido α -lipóico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
Asc•-	Radical ascorbil
AscH ⁻	Monoânion ascorbato
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CAF	Cafeína
CAT	Catalase
CA1	Corno de Arnon 1
-CH•-	Radical metino
-CH ₂ -	Metileno
CORT	Cortisol
DHLA	Ácido dihidrolipóico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DZP	Diazepam
EBA	Entrada nos braços abertos
EBF	Entrada nos braços fechados
EC	Estresse comportamental
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EEPA	Extrato etanólico de própolis amarela
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E.P.M	Erro padrão da média
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FXT	Fluoxetina
G	Grama
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutaciona peroxidase
GR	Receptor de glicocorticóide

GRed	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
GST	Glutaciona S-transferase
HO ₂ •	Radical hidroperoxil
HOCl	Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IMAOs	Inibidores da monoamino-oxidase
i.p.	Intraperitoneal
KA	Ácido kaínico
Kg	Quilograma
L	Litros
L•	Radical lipídico
LCE	Labirinto em cruz elevado
LH	Ácido graxo polinsaturado
LO•	Radical lipídico alcóxil
LOO•	Radical lipídico peróxil
LOOH	Radical lipídico hidroperoxido
m	Metros
M	Molar
mA	Miliampére
MCD	Memória de curta duração
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mTOR	Proteína quinase <i>alvo da rapamicina em mamíferos</i>
m/v	Massa/volume
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaNO ₂	Nitrato de sódio
NK	Células natural killer
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar

nmol	Nanomolar, nanomol
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO ₂ ⁻	Ânion nitrito
NO ₃ ⁻	Ânion nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₃	Ozônio
¹ O ₂	Oxigênio singlete
OH•	Radical hidroxila
ONOO-	Peroxinitrito
p	Desvio padrão
P.A	Grau analítico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
Rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
sGC	Enzima guanilato ciclase solúvel
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TEAC	Capacidade antioxidante trolox equivalente
TBA	Tempo nos braços abertos
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Compostos reativos do ácido tiobarbitúrico
TBF	Tempo nos braços fechados
T-O•	Radical de vitamina E
T-OH	Vitamina E reduzida
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromana-2-carboxílico
U	Unidade
%EBA	Percentagem de entradas nos braços abertos
%TBA	Percentagem de tempo nos braços abertos
λ	Lambda, comprimento de onda

μL	Microlitro
μM	Micromol
μmol	Micromol
5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
5-HTT	Transportador 5-hidroxitriptamina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Própolis.....	18
1.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1.1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	20
1.1.3 AÇÕES FARMACOLÓGICAS.....	26
1.2 Considerações gerais sobre transtornos no SNC.....	29
1.2.1 ANSIEDADE.....	29
1.2.2 DEPRESSÃO.....	34
1.2.3 MEMÓRIA.....	37
1.3 Bioquímica oxidativa.....	41
1.3.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	41
1.3.2 ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO.....	42
1.3.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	43
2. OBJETIVOS.....	48
2.1 Objetivo Geral.....	49
2.2 Objetivos Específicos.....	49
3 METODOLOGIA.....	50
3.1 Obtenção do extrato.....	51
3.2 Medicamentos e soluções utilizadas.....	51
3.3 Animais.....	52
3.4 Testes Neurocomportamentais.....	52
3.4.1 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	55
3.4.2 TESTE DO LCE.....	56
3.4.3 TESTE DO NADO FORÇADO.....	59
3.4.4 TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA.....	61
3.5 Bioquímica Oxidativa.....	63
3.5.1 DOSAGEM DE NO.....	63
3.5.2 DETERMINAÇÃO DE MDA.....	64
3.5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	65
3.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CAT.....	66
3.5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD.....	66

3.6 Análise Estatística.....	67
4 RESULTADOS.....	68
4.1 Testes Neurocomportamentais.....	69
4.1.1 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	69
4.1.2 TESTE DO LCE.....	71
4.1.3 TESTE DO NADO FORÇADO.....	73
4.1.4 TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA.....	74
4.2 Bioquímica Oxidativa.....	75
4.2.1 DOSAGEM DE NO.....	75
4.2.2 DETERMINAÇÃO DE MDA.....	76
4.2.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	77
4.2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CAT.....	78
4.2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD.....	79
5 DISCUSSÃO.....	80
6 CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS.....	94
ANEXOS.....	109

I INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.2 Própolis

1.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A própolis é um material resinoso elaborado pelas abelhas que coletam matéria-prima de diversas partes de plantas como brotos, cascas e exsudatos de árvores, transformando-as dentro da colméia pela adição de secreções salivares e cera (BURDOCK, 1998; RUSSO et al. 2002; BANKOVA, 2005). É utilizada para proteger a colméia contra insetos e micro-organismos, empregando-a em finas camadas nas suas paredes internas, para vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colméia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (BANKOVA et al. 2000).

O termo *própolis* é derivado do grego, onde *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colméia (MARCUCCI, 1996; BURDOCK, 1998). É considerada a mais importante "arma química" das abelhas contra os microrganismos e agentes patogênicos (BANKOVA, 2005).

De característica lipofílica, a própolis é um material duro e quebradiço, porém quando aquecido se torna macio, maleável, gomoso e muito pegajoso. Possui um cheiro aromático característico; sua cor varia de verde, amarelo, vermelho a marrom escuro, dependendo de sua origem (figura 1) (WAGH, 2013).



Figura 1. Própolis bruta.

Fonte: <http://www.apinep.com.br/> Acesso em: 10/09/2015

Os egípcios a utilizavam para embalsamar os seus cadáveres, os incas como agente antipirético, médicos gregos e romanos como antisséptico bucal e no tratamento tópico de feridas cutâneas e das mucosas. Os antigos judeus consideravam o tzori (a palavra hebraica para própolis) como um medicamento. A própolis foi incluída como droga oficial nas farmacopéias de Londres no século 17. Tornou-se muito popular na Europa entre os séculos 17 e 20, devido sua atividade antibacteriana. Durante a Segunda Guerra Mundial, foi empregada para o tratamento da tuberculose. Nos países dos Balcãs, foi aplicada para tratar feridas e queimaduras, dor de garganta e úlcera de estômago (KUROPATNICKI et al. 2013; WAGH, 2013).

A própolis é um produto natural conhecido e utilizado pelo homem há séculos. Sua utilização remonta à 300 anos a.C. e continua até hoje na forma de remédios

caseiros, cremes dentais, cremes, pomadas, gotas, e suplemento dietético (KUROPATNICKI et al. 2013).

A ampla aplicação da própolis na medicina moderna tem atraído cada vez mais atenção à sua composição química. Muitos estudos têm revelado que os efeitos observados podem ser o resultado de uma ação sinérgica dos seus complexos constituintes (HUANG et al. 2014).

1.1.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A composição química da própolis é altamente variável e depende da flora no local da coleta, já que as abelhas utilizam diferentes plantas em diferentes ecossistemas. Além disso, a época do ano, clima, gênero e/ou espécie da abelha, método de extração também influem na composição da mesma. Isto acaba limitando sua aplicação terapêutica e utilização pela indústria farmacêutica (MARCUCCI, 1995; BANKOVA et al. 2000; ADELMANN, 2005; DALEPRANE et al. 2013).

A composição química da própolis de zonas tropicais é muito diferente daquela das zonas temperadas devido à diferença de vegetação. Diferentes compostos foram relatados na própolis tropical, derivados terpenóides e prenilados do ácido p-cumárico na própolis brasileira, lignanas na própolis chilena, e benzofenonas poliisopreniladas na própolis venezuelana, brasileira e cubana. *Clusia spp.*, *Araucaria heterophylla*, e diferentes *Baccharis spp.* foram relatados como fontes principais da própolis tropical (BANSKOTA et al.1998; BANKOVA et al. 2000; CUESTA et al. 2007).

Alguns autores sugerem que as fontes botânicas prováveis para a própolis brasileira podem ser principalmente a *Baccharis spp.* e *Araucaria sp.* (BANKOVA et al. 1998; BANSKOTA et al.1998).

De modo geral, a própolis é composta de 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de compostos orgânicos diversos. Foram identificados mais de 300 substâncias de diferentes grupos químicos, tais como: polifenóis; ácidos benzóicos e derivados; álcool cinâmico e ácido cinâmico e seus derivados; hidrocarbonetos sesquiterpenos e triterpenos; derivados do benzaldeído; outros ácidos e respectivos derivados; álcoois, cetonas e compostos heteroaromáticos; álcoois de terpeno e sesquiterpeno e seus derivados; hidrocarbonetos alifáticos; minerais; esteróis e hidrocarbonetos esteróides; açúcares e aminoácidos (WAGH, 2013).

No Brasil, doze tipos distintos de própolis foram quimicamente caracterizados e classificados de tipo 1 a 12 (figura 2) (PARK et al. 2002).



Figura 2. Extratos etanólicos dos 12 grupos de própolis brasileira
Fonte: Alencar, 2002.

Recentemente, foi encontrada uma própolis vermelha no nordeste brasileiro a qual foi classificada como própolis do grupo 13 (quadro 1) (DAUGSCH et al., 2008).

Quadro 1: Classificação da própolis brasileira, de acordo com suas características físico-químicas e origem. Local de coleta: RS- Rio Grande do Sul; PR- Paraná; BA- Bahia; PE- Pernambuco; CE- Ceará; PI- Piauí; SP- São Paulo; AL- Alagoas. (PARK et al. 2002; DAUGSCH et al., 2008)

GRUPO	COLORAÇÃO	ORIGEM
Grupo 1 (RS)	Amarelo	Sul
Grupo 2 (RS)	Castanho claro	Sul
Grupo 3 (PR)	Castanho escuro	Sul
Grupo 4 (PR)	Castanho claro	Sul
Grupo 5 (PR)	Marrom esverdeado	Sul
Grupo 6 (BA)	Marrom avermelhado	Nordeste
Grupo 7 (BA)	Marrom esverdeado	Nordeste
Grupo 8 (PE)	Castanho escuro	Nordeste
Grupo 9 (PE)	Amarelo	Nordeste
Grupo 10 (CE)	Amarelo escuro	Nordeste
Grupo 11 (PI)	Amarelo	Nordeste
Grupo 12 (SP)	Verde ou marrom esverdeado	Sudeste
Grupo 13 (AL)	Vermelho	Nordeste

Populus alba, *Hyptis divaricata* e *Baccharis dracunculifolia* seriam as principais fontes vegetais para propolis dos grupos 3, 6 e 12, respectivamente (PARK et al. 2002).

Foram identificados vários flavonóides na composição química do extrato oleoso de própolis marrom coletada no Paraná, sendo os flavonóides dihidrokaempferida, kaempferida e isosakuranetin, seus constituintes principais. Além de flavonóides, vários ácidos fenólicos prenilados foram identificados tais como ácido 3,4-di-hidroxi-5-prenil-cinâmico, ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico e ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3-di-hidrocinnamoil-oxi)-3-metil-2-butenil]-5-prenil-fenil}-2-

propenóico e ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico também conhecido por Artepellin C (REIS et al. 2014).

Segundo Alencar (2002) na própolis amarela do grupo 1 não foi identificado nenhum flavonóide, e as própolis amarelas dos grupos 9, 10 e 11 apresentaram poucos compostos fenólicos e com teores que não excederam 1,2 mg/g (quadro 2).

Quadro 2. Teor de compostos fenólicos determinados por CLAE nos 12 grupos de própolis brasileira. Fonte: Alencar, 2002.

Teor em mg/g de própolis												
Compostos fenólicos identificados	Grupos de própolis											
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10	G11	G12
1 (ácido cumárico)	-	-	1,2	3,8	17,7	-	-	-	0,5	0,2	0,2	8,5
2 (ácido ferrúlico)	-	-	1,4	-	4,6	-	-	-	-	-	-	2,4
6 (quercetina)	-	-	-	-	-	-	-	6,8	-	-	-	-
7 (pinobanksina)	-	-	37,4	-	-	-	-	-	-	-	-	8,7
8 (hisperetina)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-	-	-
9 (kanferol)	-	-	5,1	1,6	-	-	1,4	-	-	-	-	0,4
10 (apigenina)	-	-	7,9	-	-	-	2,2	-	-	-	0,3	0,3
11 (isoramnetina)	-	-	-	-	-	-	-	3,4	-	-	-	-
13 (sakuranetina)	-	13,2	-	-	-	-	18,1	-	-	-	-	-
14 (isosakuranetina)	-	-	-	12	7,5	-	-	-	-	-	-	7,3
15 (pinocebrina)	-	-	22,6	-	-	-	-	72,1	-	-	-	-
16 (éster do ácido dimetil dialil caféico)	-	-	9,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 (pinobanksina-3-acetato)	-	-	36,2	-	-	-	-	14,1	-	-	-	-
18 (crisina)	-	2,1	39,9	4,2	-	-	-	19,7	-	-	-	-
19 (acacetina)	-	-	-	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-
20 (galangina)	-	-	33,6	-	-	-	-	21,1	-	-	-	-
21 (kanferide)	-	-	-	2,4	-	-	-	-	-	-	-	12,3

*Os valores acima representam média de duas repetições

A própolis amarela do grupo 1 apresentou vários terpenóides (figura 3) na sua composição, como por exemplo ácido murônico, mirtenol, 1-alfa terpineol, junipeno, 1-trans-pinocarveol, verbenona, viridiflorol, spatulenol e (+)-aromadendreno, que não foram encontrados em nenhum outro grupo de própolis (Alencar, 2002).

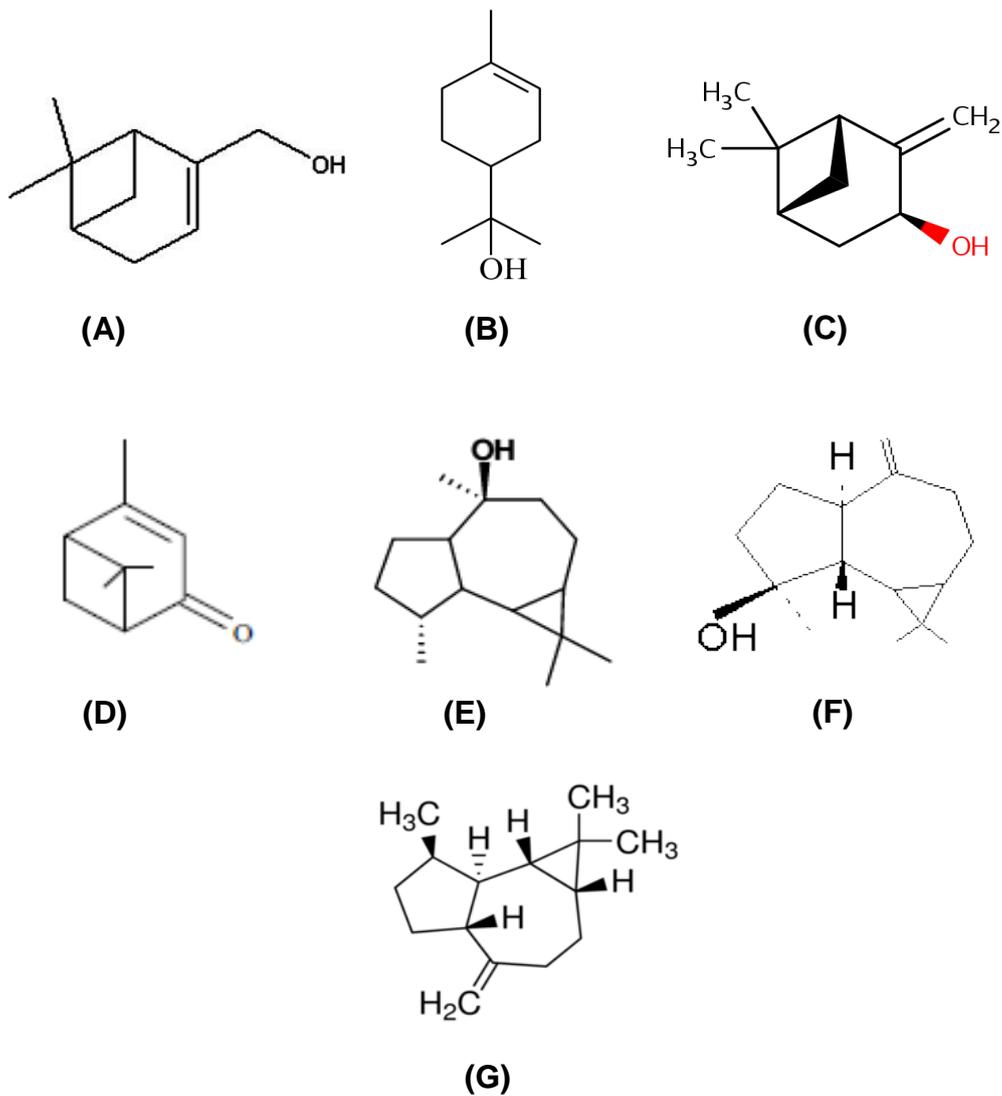


Figura 3. Estrutura química do mirtenol (A), α -terpineol (B), 1-trans-pinocarveol (C), verbenona (D), viridiflorol (E), spatulenol (F), (+)-aromadendreno (G).

Fonte: BARRERA et al. 2008; BHATIA et al. 2008; SOUZA et al. 2011.

Os compostos alifáticos (terpenóides e esteróis) são os principais componentes da própolis amarela cubana, particularmente triterpenos, tais como β -amirina, lupeol e 24-metileno-9,19-ciclolanostan-3 β -ol (CUESTA et al. 2007; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ et al. 2010).

Recentemente, Fernandes e colaboradores (2012) identificaram vinte e uma substâncias no óleo essencial da própolis do Cerrado de Mato Grosso do Sul, havendo predominância da classe dos sesquiterpenos (99,7%). Os componentes

majoritários foram: β -cariofileno (7,8%), δ -cadineno (7,6%), e spatulenol (6,6%) e *allo*-aromadendreno (4,5%) (figura 4).

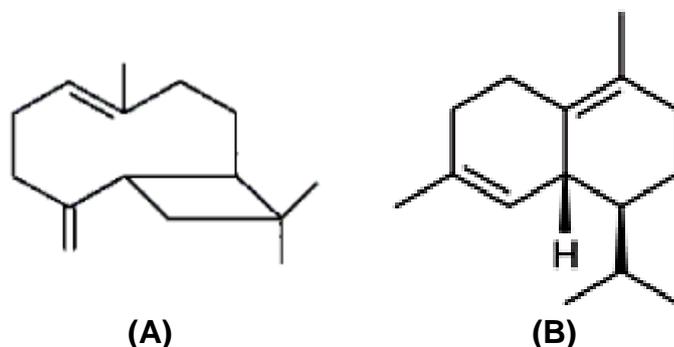


Figura 4. Estrutura química do β -cariofileno (A) δ -cadineno (B)
Fonte: NUNES et al. 2000; SANT'ANNA et al. 2007.

Na própolis amarela do Mato Grosso do Sul (EEP-A MT), utilizada neste trabalho, foram encontrados baixos teores de compostos fenólicos e flavonóides, similar à própolis amarela cubana (EMP-A Cuba) (quadro 3). Porém, esses teores se encontram dentro do estabelecido pela legislação brasileira, a qual determina como requisito de qualidade para extratos etanólicos de própolis um teor mínimo de 0,5% de fenólicos totais e de 0,25% de flavonóides totais (BRASIL, 2001).

Quadro 3. Valores dos teores médios de fenólicos e flavonóides obtidos para os seis extratos de própolis (própolis verde: EEP-V MG e EEP-V SP; própolis vermelha EEP-VM BA; própolis marrom: EEP-M PR; própolis amarela: EEP-A MT e EMP-A Cuba) (KOLC, 2014).

Tipo de própolis	Fenólicos (mg/g)	Desvio padrão relativo (%)	Fenólicos (%)	Flavonóides (mg/g)	Desvio padrão relativo (%)	Flavonóides (%)
EEP-V MG	234,65± 75,19 ^a	3,56	23,46± 7,52 ^a	40,45 ± 10,86 ^a	3,00	4,04±1,09 ^a
EEP-V SP	293,96± 154,70 ^b	5,85	29,39± 15,47 ^b	45,58 ± 24,34 ^b	5,95	4,56±2,43 ^b
EEP-VM BA	215,23± 73,75 ^a	13,79	21,52±7,38 ^a	38,94 ± 25,78 ^a	7,37	3,89±2,58 ^a
EEP-M PR	161,40 ± 72,68 ^c	4,97	16,13±7,27 ^c	7,30 ± 0,00 ^c	0	0,73±0,00 ^c
EEP-A MT	26,70± 4,54 ^d	12,82	2,67±0,45 ^d	2,14 ± 1,78 ^{d,e}	10,65	0,21±0,18 ^{d,e}
EMP-A Cuba	19,42± 6,18 ^d	6,85	1,94±0,62 ^d	4,11 ± 3,93 ^{c,e}	9,25	0,41±0,39 ^{c,e}

*Valores médios ± intervalo 95%. **Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Foram identificados 15 compostos na EEP-A MT, todos pertencentes à classe dos triterpenos, semelhantes estruturalmente ao lupeol e a β -amirina (figura 5) (KOLC, 2014).

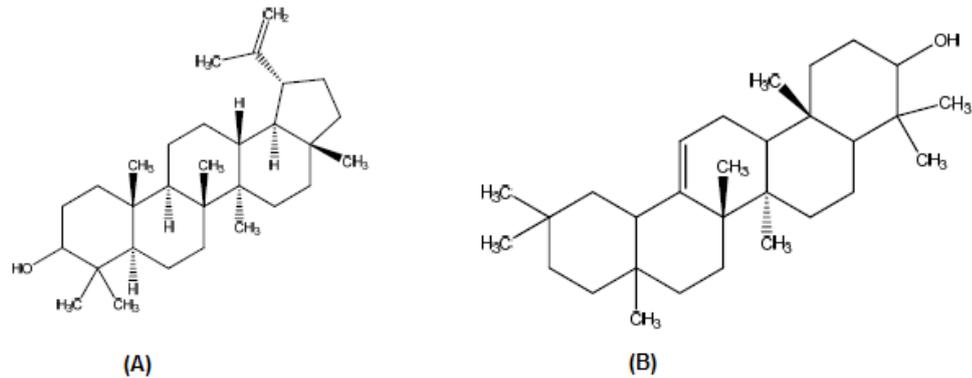


Figura 5. Estrutura química do lupeol (A) e β -amirina (B)
Fonte: KOLC, 2014.

Os compostos terpênicos observados em sua composição, alguns com propriedades farmacológicas já comprovadas, surgem como potenciais fármacos para as doenças humanas, inclusive àquelas que afetam o Sistema Nervoso Central (SNC).

1.1.3 AÇÕES FARMACOLÓGICAS

O potencial terapêutico da própolis tem sido objeto de numerosos estudos que têm demonstrado suas diversas atividades farmacológicas: antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, cardioprotetora, antiangiogênica, antioxidante, neuroprotetora (BANSKOTA et al. 2001; FAROOQUI et al. 2012; DALEPRANE et al. 2013; WAGH, 2013).

As doenças neurológicas são acompanhadas por um aumento do estresse oxidativo e indução de sinalização inflamatória no tecido cerebral. Trabalhos recentes têm demonstrado que a própolis é um candidato eficaz para tratamento de estresse oxidativo e neuroinflamação em doenças neurológicas (FAROOQUI et al. 2012).

Compostos antioxidantes presentes na própolis, reduzem os níveis celulares de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO), e possuem importante atividade imunomoduladora. Foi relatado que a própolis aumenta a resposta imune celular através do aumento do RNAm para o interferon- γ e ativa a produção de citocinas (FISCHER et al. 2007; CARDOSO et al. 2011; DALEPRANE et al. 2013).

Zhao et al. (2009) avaliaram o potencial hepatoprotetor da própolis frente ao estresse oxidativo induzido por mercúrio e alteração de enzimas antioxidantes em fígados de camundongos. A própolis inibiu a peroxidação lipídica e o nível de glutathiona oxidase, resultando em um maior nível de glutathiona (GSH). A atividade das enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-S-transferase, e glicose-6-fosfato-desidrogenase, também foi restaurada após a administração da própolis.

O efeito da própolis em modelos experimentais de *diabetes mellitus* sugere uma forte atividade antioxidante que pode amenizar o estresse oxidativo e retardar a ocorrência de nefropatia diabética em *diabetes mellitus* (ABO-SALEM et al. 2009; HU et al. 2011).

Proteção dose-dependente dos extratos aquoso e etanólico de própolis verde brasileira contra as espécies reativas de oxigênio (EROs), H_2O_2 , ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila ($OH\cdot$), foi determinada em células ganglionares da retina (NAKAJIMA et al. 2009).

Cardoso et al. (2011) avaliaram os efeitos neuroprotetores de um extrato etanólico de própolis, obtido da região nordeste de Portugal, contra os efeitos citotóxicos induzidos pela estaurosporina e H₂O₂ em neurônios corticais primários. Estes dois indutores de estresse agem através de vários eventos, incluindo a ativação da caspase-3. Esta protease é diretamente responsável pela clivagem proteolítica de uma variedade de proteínas fundamentais, tais como proteínas do citoesqueleto, quinases e enzimas de reparação do DNA. Pré-tratamento de neurônios corticais com extrato etanólico de própolis atenuou significativamente o aumento de EROs e inibiu a ativação da caspase-3, diminuindo a apoptose.

Degeneração neuronal e estresse oxidativo induzidos pelo ácido kaínico (KA) em ratos foram significativamente atenuados com o pré-tratamento com própolis. Este efeito contra o dano oxidativo neurotóxico induzido por KA é, em parte, via modulação do receptor de adenosina A1 (KWON et al. 2004).

Modelos neurocomportamentais têm sido empregados para avaliação da atividade da própolis no SNC. Manna et al. (2011), trabalhando com modelos animais de epilepsia, observaram que a administração oral de própolis associada ao valproato resultou em melhorias significativas nos níveis de neurotransmissores, dopamina e serotonina, no hipocampo e no soro.

Li et al. (2012) trabalhando com o óleo essencial de própolis brasileira, rico em terpenóides, observaram que a própolis reduziu o comportamento do tipo ansiogênico sem afetar a atividade locomotora, inibindo a hiperatividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal e a peroxidação lipídica no tecido cerebral.

Em outro estudo, a administração de extrato etanólico de própolis resultou em diminuição dose-dependente no tempo de imobilidade nos testes de nado forçado e

suspensão de cauda sem alteração da atividade locomotora, demonstrando atividade antidepressiva (LEE et al. 2013).

Chen et al. (2008) observaram que o extrato aquoso de própolis chinesa atenuou o comprometimento no aprendizado e memória induzido por escopolamina em camundongos, inibindo a atividade da acetilcolinesterase no córtex e hipocampo.

Em estudo recente a administração aguda de extrato oleoso de própolis em ratos provocou efeitos comportamentais como hiperlocomoção, efeitos do tipo ansiolítico e antidepressivo baseado em testes comportamentais específicos. A análise da bioquímica oxidativa demonstrou que o extrato oleoso inverteu os efeitos negativos do estresse comportamental (REIS et al. 2014).

Devido à sua atividade antioxidante, a própolis surge como um promissor agente na proteção das células neurais contra o estresse oxidativo e neuroinflamação associados ao envelhecimento e doenças do SNC.

1.2 Considerações gerais sobre transtornos no SNC

1.2.1. ANSIEDADE

O medo e a ansiedade são emoções normais, enquanto o medo ocorre em resposta a ameaças específicas, a fonte do comportamento ansioso é normalmente indefinida (CAMPOS et al. 2013).

A ansiedade é uma sensação subjetiva de inquietude e apreensão, vivenciada em situações onde o perigo é apenas vago e potencial. Sua finalidade também é preparar o organismo para uma possível situação de enfrentamento. No entanto,

dependendo da intensidade, da frequência e do contexto no qual é apresentada, pode adquirir papel desajustador (CRUZ et al. 1997).

Em contraste com a ansiedade normal/adaptativa, transtornos de ansiedade afetam o desempenho individual em tarefas diárias, representando um alto custo para a saúde pública em todo o mundo. Em 2010, 272,2 milhões de pessoas no mundo apresentaram algum tipo de transtorno de ansiedade (CAMPOS et al. 2013; BAXTER et al. 2014).

Os transtornos de ansiedade são divididos em seis categorias distintas, de acordo com o Manual Diagnóstico e Estatístico da Associação Americana de Psiquiatria, que incluem: transtorno de ansiedade generalizada, fobia social, fobia simples, transtorno do pânico, transtorno de estresse pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo (LEONARDO & HEN, 2008).

Algumas estruturas cerebrais têm sido implicadas nos mecanismos da ansiedade, incluindo a amígdala, hipocampo e córtex pré-frontal (figura 6). Além disso, existe evidência de que a modulação monoaminérgica desempenha um papel importante e que o sistema de resposta hormonal ao estresse está envolvido na patofisiologia da ansiedade e distúrbios do humor (LEONARDO & HEN, 2008; DIAS et al. 2013).

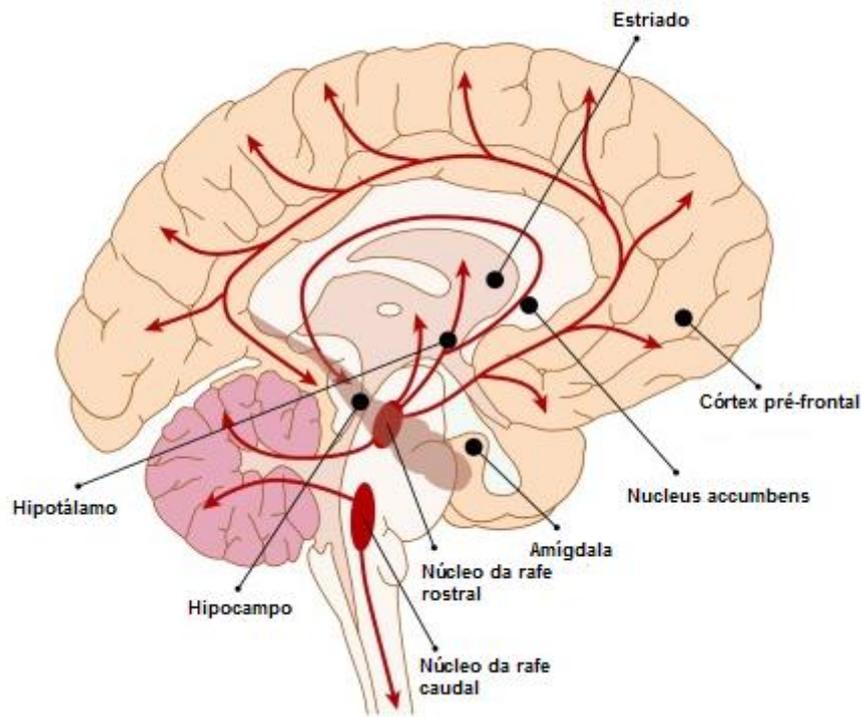


Figura 6. Estruturas cerebrais envolvidas na fisiopatologia da ansiedade
 Fonte: Adaptado de PIERZ & THASE, 2014.

A amígdala recebe informações sensoriais brutas sobre os estímulos indutores de ansiedade diretamente do tálamo, e informações mais processadas de áreas corticais e hipocampo. Essas informações são projetadas pela amígdala para estruturas como o *locus coeruleus*, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo e estriado, que auxiliam os aspectos executivos da ansiedade, incluindo respostas autônomas, endócrinas e esquelético-motoras. Enquanto a amígdala pode ser uma região de gatilho predominantemente responsável pela indução de certas emoções, o córtex pré-frontal parece ser uma importante região moduladora para o controle emocional (FURMARK, 2009).

A estrutura amigdalar é essencial para a experiência de medo, uma vez que induz às respostas autonômicas e endócrinas associadas. Além disso, a saída da amígdala para a matéria cinzenta periaquedutal é responsável pelo comportamento

de aversão associado ao medo. Por outro lado, o hipocampo é associado com o medo de re-experimentar. Os sintomas dos transtornos de ansiedade refletem a ativação dos mecanismos do medo que envolvem estas estruturas. O córtex pré-frontal, insula e giro cingulado também são essenciais na mediação central da ansiedade (KWON & PARK, 2014).

Molecularmente, a inibição do ácido gama-aminobutírico (GABA) é um fator importante na patogênese da ansiedade (MULA et al. 2007). O receptor $GABA_A$ desempenha um papel central no controle da excitação e medo. Drogas que estimulam os receptores $GABA_A$, tais como benzodiazepínicos (ex. diazepam) e barbitúricos, podem controlar a ansiedade, reduzindo a excitabilidade neuronal (figura 7) (MULA & MONACO, 2009).

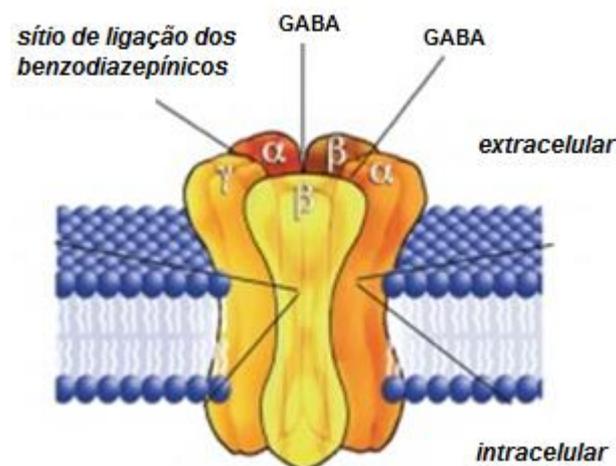


Figura 7. Receptor $GABA_A$
Fonte: Adaptado de LONGONE et al. 2011

Os inibidores seletivos da recaptação da serotonina e antidepressivos tricíclicos são eficazes no controle dos sintomas de ansiedade. Uma vez que estes medicamentos aumentam a concentração de serotonina na sinapse, os efeitos destes medicamentos ansiolíticos sugerem que a serotonina desempenha um papel crucial nos transtornos de ansiedade (figura 8) (KWON & PARK, 2014).

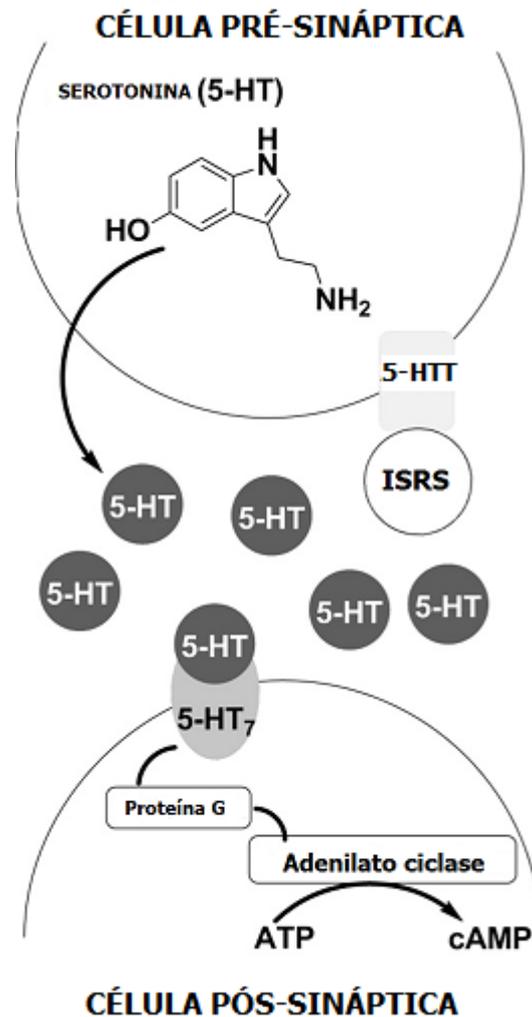


Figura 8. Mecanismo de atividade serotoninérgica. A serotonina é liberada nas sinapses e se liga ao seu receptor (5-HT) nas células pós-sinápticas. Receptor de serotonina, acoplado com uma proteína G, ativa a adenilato ciclase, resultando na produção de AMPc e ativação de cascatas enzimáticas que conduzem a efeitos serotoninérgicos.
 Fonte: Adaptado de HAJIRAHIMKHAN et al. 2013.

A modulação de canais de cálcio é outro fator importante na patofisiologia da ansiedade (MULA et al. 2007). Dos vários subtipos de canais de cálcio, os canais de cálcio de alta voltagem controlam a liberação de neurotransmissores excitatórios nas sinapses (MULA & MONACO, 2009). Em modelos animais de ansiedade, bloqueadores do canal de cálcio suprimiram os sintomas da ansiedade (CHUGH et al. 1992; SAAD et al. 1997).

Diversos fármacos, de diferentes classes terapêuticas, são utilizados no tratamento dos transtornos de ansiedade. No entanto, os vários efeitos adversos que apresentam, como por exemplo os observados com o uso dos benzodiazepínicos (sedação, amnésia, abuso e/ou dependência, síndrome de abstinência e interações com outros depressores do SNC), justificam a busca de alternativas terapêuticas.

Ansiedade e depressão são frequentemente co-morbidades, e na prática clínica é difícil avaliá-las separadamente, pois ambas compartilham sintomas afetivos negativos (LAPIZ-BLUHM et al. 2008; KWON & PARK, 2014).

1.2.2 DEPRESSÃO

A depressão é um transtorno mental caracterizado por tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa ou baixa auto-estima, distúrbios do sono ou do apetite, sensação de cansaço e falta de concentração. Globalmente, mais de 350 milhões de pessoas de todas as idades sofrem de depressão. É a principal causa de incapacidade em todo o mundo, e é um dos principais contribuintes para a carga global de doenças. Metade das pessoas afetadas no mundo (em alguns países, menos de 10%) recebem tratamento adequado (WHO, 2012).

As primeiras hipóteses biológicas postulavam que a depressão estaria relacionada ao funcionamento bioquímico inadequado da atividade de neurotransmissores, notadamente da serotonina, noradrenalina e dopamina. Atualmente ganha força teorias baseadas no desequilíbrio entre os sistemas de neurotransmissão e na desregulação dos neuroreceptores (figura 9) (BALLONE, 2007).

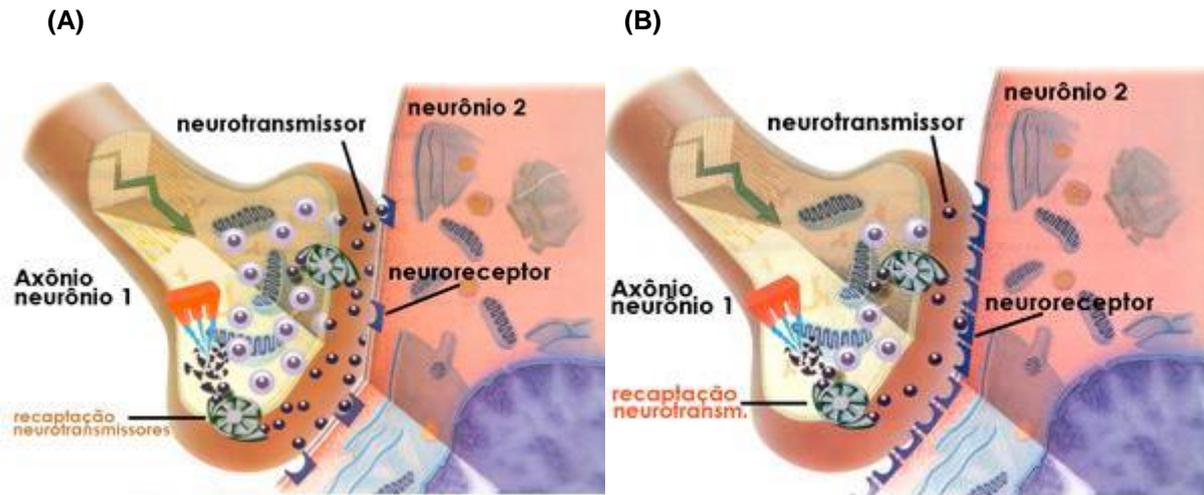


Figura 9. Fisiopatologia da depressão. Níveis normais de neurotransmissores e neurorreceptores **(A)**; número aumentado de neurorreceptores e níveis baixos de neurotransmissores **(B)**.

Fonte: BALLONE, 2007.

Receptores 5-hidroxitriptamina (5-HT) são ativados pelo neurotransmissor serotonina, enquanto o transportador 5-hidroxitriptamina (5-HTT) recapta a serotonina da fenda sináptica. Alteração na função do 5-HT e/ou 5-HTT pode estar associada com transtornos mentais (LIN et al. 2014).

Os principais tipos de antidepressivos são os inibidores da recaptação de monoaminas, entre os quais temos: a) os inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ex. fluoxetina), que atuam por inibir a recaptação de serotonina (5-HT) pelas terminações nervosas monoaminérgicas; b) antagonistas do receptor da monoamina; c) inibidores da monoamino-oxidase (IMAOs) (Rang & Dale, 2011).

Outras evidências sugerem que o sistema glutamatérgico também desempenha um papel fundamental na neurobiologia e tratamento da depressão (figura 10) (JAVITT, 2004; HASHIMOTO et al. 2007; HASHIMOTO, 2009; SKOLNICK et al. 2009; ZARATE et al. 2010; HASHIMOTO, 2011; TOKITA et al. 2012; HASHIMOTO, 2013).

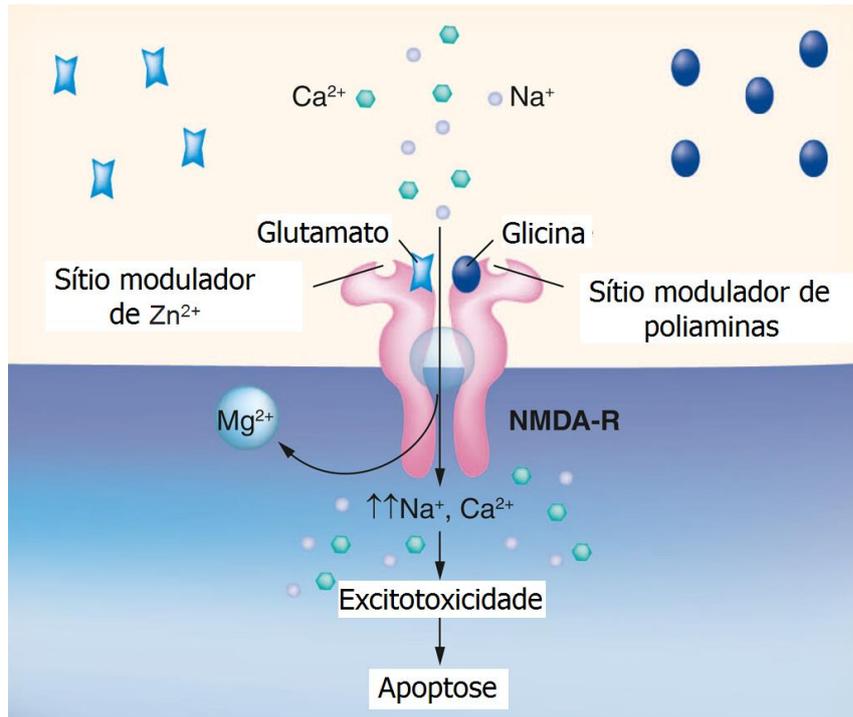


Figura 10. Interação de glutamato com receptores NMDA (NMDA-R). Em muitas doenças neurodegenerativas ocorre a liberação excessiva de glutamato por terminais pré-sinápticos, que ao ligar-se a NMDA-R pós-sinápticos, causam despolarização da membrana pós-sináptica, através da remoção do bloqueio de Mg^{2+} . Influxo subsequente e acúmulo de cálcio em excesso leva à excitotoxicidade e apoptose neuronal.

Fonte: Adaptado de SHIH & CALKINS, 2012.

O mecanismo de ação de antagonistas do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), que reduzem os sintomas depressivos, parece ser, em parte, através da liberação de glutamato para os receptores não-NMDA, incluindo ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) e receptores metabotrópicos (DUTTA et al. 2015).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC em mamíferos, o qual está envolvido em vários distúrbios do humor, tais como ansiedade, depressão e esquizofrenia. Hoje em dia, evidências crescentes mostram que a depressão está relacionada com uma deficiência de GABA no cérebro. No entanto, há inúmeros estudos com base na hipótese da monoamina e disfunção do sistema

glutamatérgico, enquanto estudos sobre o GABA são relativamente menores e dispersos (LI et al. 2014).

Um dos maiores objetivos da pesquisa psiquiátrica moderna é elucidar a etiologia relacionada aos transtornos de humor, o que iria auxiliar no desenvolvimento de novos tratamentos antidepressivos eficazes (SLATTERY et al. 2012).

Tem sido relatados déficits nas funções da memória executiva e declarativa relacionados à depressão. Sintomas cognitivos associados à depressão são caracterizados por um viés de processamento de informações pertinentes ao humor, bem como por déficits do desempenho cognitivo (KONRAD et al. 2015).

1.2.3 MEMÓRIA

O termo memória refere-se ao processo mediante o qual adquirimos, formamos, conservamos e evocamos informação. As memórias são codificadas por neurônios, armazenadas em redes neurais e evocadas por essas mesmas redes ou outras vias. São moduladas pelas emoções, pelo nível de consciência e pelos estados de humor. A memória humana é parecida com a dos demais mamíferos no que se refere aos seus mecanismos essenciais. Por exemplo, quando submetidos a um estímulo que causa aversão, aprendem basicamente a mesma coisa: evitar esse estímulo. Isto constitui uma forma de aprendizado denominada esquiva inibitória (CAMMAROTA et al. 2008).

Há formas de memórias que duram poucos segundos ou minutos (memória de trabalho), poucas horas (memória de curta duração) e poucos dias (memória de longa duração). A memória de trabalho retém as informações à medida que vão

surgindo, por um curto tempo a seguir. A memória de curta duração é um processo mnemônico desenvolvido no hipocampo e no córtex entorrinal, dura no máximo seis horas, e serve para armazenar provisoriamente a informação que depois poderá ou não ser armazenada como memória mais estável ou permanente. Na construção da memória de longa duração são necessárias a expressão gênica e a síntese protéica nas primeiras três a seis horas, no hipocampo ou em outras regiões vinculadas a esse processo (figura 11) (IZQUIERDO et al. 1998; CAMMAROTA et al. 2003; IZQUIERDO et al. 2006).

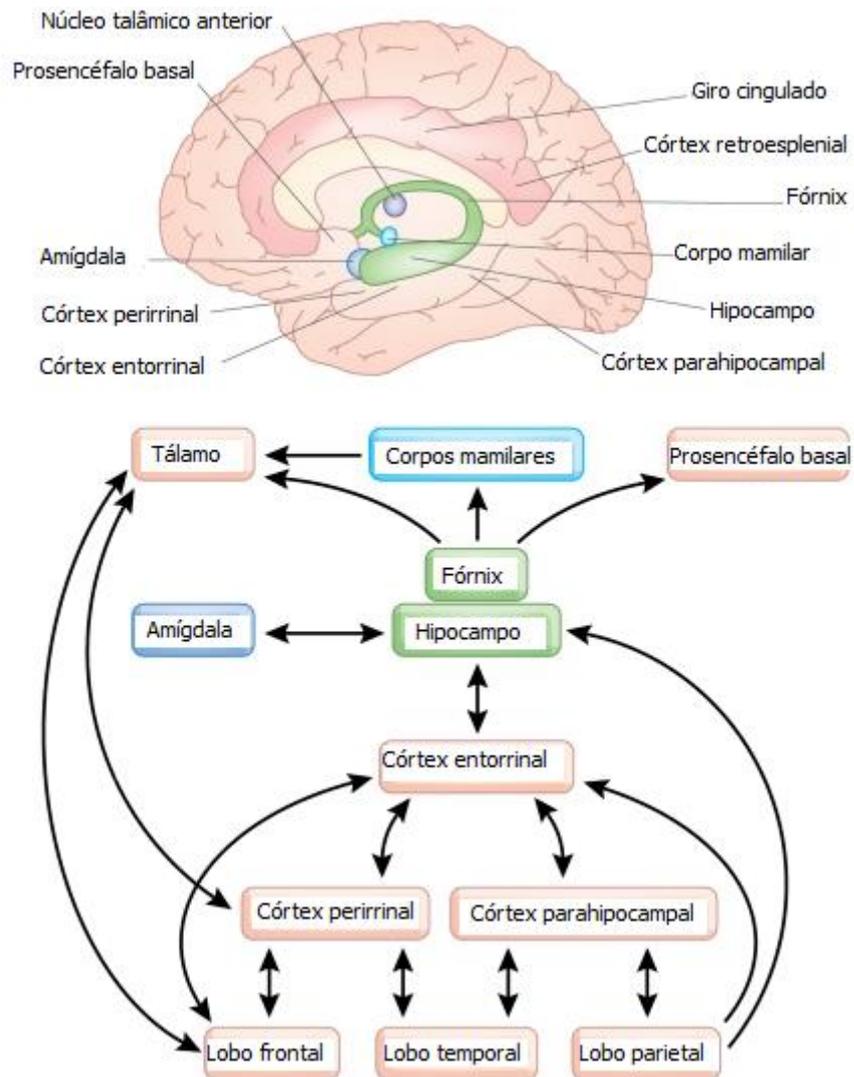


Figura 11. As áreas do cérebro envolvidas na memória e suas respectivas conexões.

Fonte: Adaptado de NADEL & HARDT, 2011.

A consolidação da memória é o processo de formação de um arquivo de memória no cérebro. Isto ocorre inicialmente no hipocampo, muitas vezes com a participação concomitante do córtex parietal entorrinal e posterior; e o complexo nuclear basolateral da amígdala. Este processo leva de 1 a 6 horas e envolve a ativação serial e paralela de vários sistemas de proteína-quinase no hipocampo, e a estimulação resultante de diversas proteínas celulares, incluindo fatores de transcrição nucleares que desencadeiam a transcrição de DNA, que é seguido por síntese de proteínas em ribossomas, e coexiste com um sistema dendrítico extra-ribossômico independente mediado por mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), o qual usa RNAm pré-existentes. O sistema de mTOR também é desencadeado por proteínas cinases e pelo fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e produz a subunidade GLUR1 do receptor de glutamato AMPA, que é necessário para a consolidação da informação (FURINI et al. 2013).

Estudos demonstram que lesões do córtex, região do Corno de Arnon 1 (CA1) do hipocampo e corpo estriado que levam à isquemia cerebral com perda neuronal são causas de graves déficits de aprendizagem e de memória (OLTON et al. 1978; MORRIS et al. 1982; MIYAMOTO et al. 1991; LEE et al. 2011), e o estresse oxidativo e as reações inflamatórias subsequentes podem desempenhar um papel patológico importante na morte neuronal (MENG et al. 2014).

Muitos estudos têm sugerido uma relação entre as funções de aprendizagem e memória e o sistema colinérgico. Os neurônios colinérgicos originários no septo medial projetam-se para áreas tais como o córtex e o hipocampo, que desempenham um papel na cognição associada a acetilcolina (ACh). Lesões nessas vias levam a uma diminuição na liberação de ACh, causando disfunção da memória

e aprendizagem (LEE et al. 2011). Tem sido fortemente demonstrada a influência do mecanismo colinérgico na função cognitiva, pelo fato de que os inibidores da colinesterase são eficazes no alívio dos sintomas de doença de Alzheimer (SUBEDEE et al. 2015).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central e os neurônios GABAérgicos fornecem extensa inervação para neurônios colinérgicos e glutamatérgicos. Demonstrou-se que a disfunção do sistema GABAérgico pode contribuir para o enfraquecimento cognitivo em humanos. Reduções significativas nos níveis de GABA tem sido descritas em casos severos da doença de Alzheimer (SOLAS et al. 2015).

Devido às suas propriedades de aumento da cognição, a cafeína tem sido considerada como uma droga potencial para reverter o declínio cognitivo relacionado com a idade (RIEDEL & JOLLES, 1996; ROSSO et al. 2008). Age como um varredor de radicais OH•, impede a peroxidação lipídica e inibe o estresse oxidativo induzido por EROs (SHI et al. 1991; DEVASAGAYAM et al. 1996).

ULLAH e colaboradores (2015) observaram que o tratamento crônico com cafeína previne o estresse oxidativo e conseqüentemente reduz a neuroinflamação, neurodegeneração, disfunção sináptica e comprometimento da memória.

Tratamentos para distúrbios da memória, como por exemplo na Doença de Alzheimer, apenas retardam a sua progressão. Além disso, efeitos adversos como tonturas, dor de cabeça, obstipação, hepatotoxicidade, náuseas, diarreia e complicações da biodisponibilidade, estão frequentemente associados aos medicamentos utilizados. Isto estimula a descoberta de medicamentos mais eficazes, preferencialmente de origem natural a fim de minimizar os efeitos adversos (AMAT-UR-RASOOL & AHMED, 2015).

Várias doenças estão relacionadas com o estresse oxidativo, dentre elas, as doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, como a ansiedade, depressão, doença de Alzheimer e Parkinson, esclerose múltipla, esclerose lateral amiotrófica, doenças cerebrovasculares, epilepsia, entre outras (HALLIWEL, 2006; HALLIWEL & GUTTERIDGE, 2007; BERK et al. 2008; LIU & SCHUBERT, 2009).

1.3 Bioquímica oxidativa

1.3.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Substâncias que têm elétrons desemparelhados e são capazes de existência independente são chamadas de radicais livres. Por esta definição, o hidrogênio atômico é um radical livre porque tem só um elétron, assim como o oxigênio molecular (O_2), que possui dois elétrons desemparelhados. O $O_2^{\cdot-}$ tem um elétron a mais do que o O_2 , portanto é mais reativo. Um outro termo muitas vezes utilizado é EROs. Este termo inclui radicais, bem como produtos químicos que podem participar em reações do tipo radical, ou seja com ganho ou perda de elétrons, mas que não são verdadeiros radicais uma vez que não possuem elétrons desemparelhados. Exemplos de EROs não radicais incluem H_2O_2 , ácido hipocloroso (HOCl), o ozônio (O_3) e oxigênio singlete (1O_2) (MAGDER, 2006).

1.3.2 ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÊNIO

Além de radicais à base de oxigênio, há também espécies reativas de nitrogênio (ERNs) tais como o NO e dióxido de nitrogênio (NO₂) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O NO, gerado em tecidos biológicos por óxido nítrico sintases específicas (NOSs) que metabolizam arginina em citrulina, é um abundante radical reativo que atua como uma importante molécula de sinalização biológica oxidativa em uma grande variedade de processos fisiológicos, incluindo a neurotransmissão, regulação da pressão arterial, mecanismos de defesa, relaxamento do músculo liso e regulação imunológica (BERGENDI et al. 1999; GHAFOURIFAR & CADENAS, 2005).

O NO se liga prontamente a determinados íons de metais de transição; na verdade muitos de seus efeitos fisiológicos são exercidos em consequência da sua ligação inicial a grupos de Fe²⁺-heme da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) (ARCHER, 1993). Tem efeitos sobre a transmissão neuronal, bem como na plasticidade sináptica no SNC. No meio extracelular, reage com o oxigênio e água para formar ânions nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) (VALKO et al. 2007).

O estresse nitrosativo pode conduzir a reações de nitrosilação, que alteram a estrutura das proteínas inibindo suas funções normais. (VALKO et al. 2007).

Um importante produto dos radicais O₂^{•-} e NO é o peroxinitrito (ONOO⁻). Apesar de não ser um radical propriamente dito, o ONOO⁻ pode resultar em processos citotóxicos, incluindo peroxidação lipídica, formação de resíduos de nitrotirosina que podem inativar enzimas, depleção de GSH, e lesão de DNA (PRYOR & SQUADRITO, 1995; BECKMAN & KOPPENOL, 1996).

1.3.3 ESTRESSE OXIDATIVO

A produção e degradação não balanceada de EROs e ERNs, isto é, sua superprodução em sistemas biológicos e deficiência de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, resulta em acúmulo dessas espécies reativas, comumente chamado de estresse oxidativo (DALEPRANE et al. 2013; BHAT et al. 2015).

EROs potencialmente danosas (ex. H_2O_2 ; $O_2^{\cdot-}$, $OH\cdot$, bem como ERNs especialmente NO, são produzidas continuamente nas células como consequência tanto do metabolismo aeróbio normal (reações bioquímicas oxidativas) quanto por fatores externos (RUSSO et al. 2002; DALEPRANE et al. 2013). Essas espécies reativas são usualmente removidas ou inativadas *in vivo* pelos antioxidantes (NAGAI et al. 2001; DALEPRANE et al. 2013).

Defesas antioxidantes enzimáticas incluem a SOD, GPx, CAT. Os antioxidantes não-enzimáticos são representadas pelo ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (Vitamina E), GSH, cisteína, carotenóides, flavonóides, e outros antioxidantes. Uma das enzimas antioxidantes mais fundamentais é a SOD, que catalisa a reação de dois $O_2^{\cdot-}$ e dois H^+ para H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 é reduzido pela CAT ou GPx. (MAGDER, 2006; VALKO et al. 2007).

Os antioxidantes de defesa têm função de prevenção da geração de EROs/ERNs, destruição de potenciais oxidantes e degradação das espécies reativas formadas. Dessa forma os danos dos tecidos induzidos pelo estresse oxidativo são mínimos (BENZIE, 1996). De qualquer forma, essas espécies reativas se tornam danosas quando são produzidas em excesso sob certas condições anormais como inflamação, isquemia e na presença de íons catalíticos (ex. Fe_2^+). Sob estas condições, os antioxidantes endógenos podem ser insuficientes para conter a

formação das mesmas, podendo causar dano celular pela peroxidação de lipídeos da membrana, inativação de sulfidril enzimas, ligações entrecruzadas de proteínas ou quebra de DNA (RUSSO et al. 2002).

Na peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo, espécies como $\text{OH}\cdot$, radical hidroperoxil ($\text{HO}_2\cdot$), e $\text{OONO}\cdot$, podem extrair um H do metileno ($-\text{CH}_2-$), criando o radical metino ($-\text{CH}\cdot-$). Este radical em seguida, ataca outros grupos $-\text{CH}_2-$ nas moléculas de lípidos e cria uma reação em cadeia que altera a fluidez e a forma da membrana. Uma consequência disto é a interrupção do transporte de cálcio, que é essencial para a sinalização intracelular (MAGDER, 2006).

Peróxidos lipídicos também podem danificar o DNA e as proteínas. Uma vez formados, os radicais $\text{LOO}\cdot$ podem ser rearranjados para endoperóxidos (precursores de MDA) através de uma reação de ciclização, sendo o MDA o produto final do processo de peroxidação (figura 12) (MAGDER, 2006; VALKO et al. 2007).

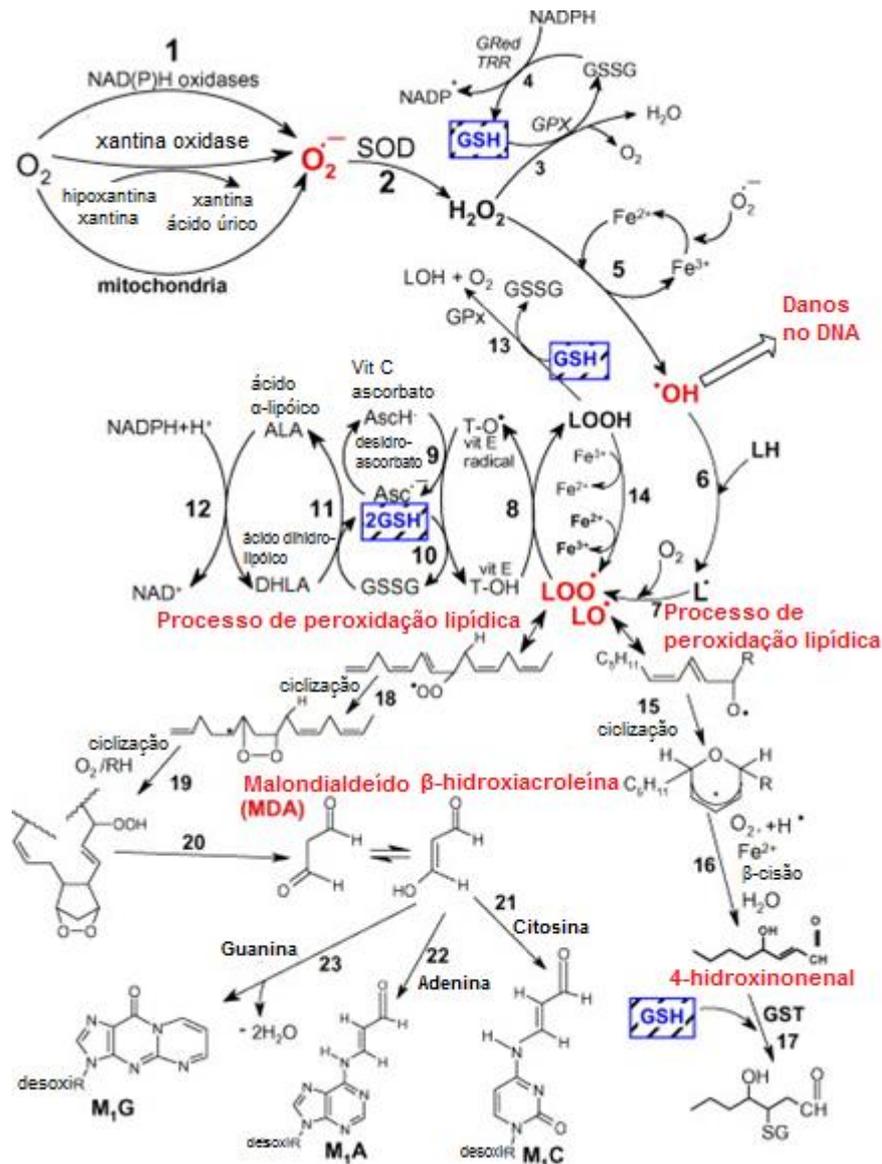


Figura 12. Vias de formação de EROs, o processo de peroxidação lipídica e o papel da GSH e outros antioxidantes (vitamina E, vitamina C, ácido lipóico) no controle do estresse oxidativo. Reação 1: O $O_2^{\cdot-}$ é formado pelo processo de redução de O_2 mediada por NADPH-oxidases e xantina-oxidase ou não enzimaticamente pelos compostos redox-reativos, tal como o composto semi-ubiquinona da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Reação 2: $O_2^{\cdot-}$ é dismutado pela SOD para H_2O_2 . Reação 3: O H_2O_2 é mais eficientemente eliminado pela enzima glutatona peroxidase (GPx), que exige a GSH como o doadora de elétrons. Reação 4: A glutatona oxidada (GSSG) é reduzido para GSH pela parte posterior da enzima glutatona redutase (GRed) que usa NADPH como o doador de elétrons. Reação 5: Alguns metais de transição (ex. Fe^{2+} , Cu^+ e outros) podem clivar o H_2O_2 ao reativo radical OH^{\cdot} (reação de Fenton). Reação 6: o radical OH^{\cdot} pode retirar um elétron do ácido graxo polinsaturado (LH) para dar origem a um radical lipídico (L^{\cdot}). Reação 7: O radical L^{\cdot} pode ainda interagir com O_2 originando o radical lipídico peroxil (LOO^{\cdot}). Se o radical LOO^{\cdot} resultante não é reduzido por antioxidantes, o processo de peroxidação lipídica ocorre (reações 18-23 e 15-17). Reação 8: O radical LOO^{\cdot} é reduzido no interior da membrana pela forma reduzida de vitamina E (T-OH radical).

OH) resultando na formação de um radical lipídico hidroperóxido (LOOH) e um radical de vitamina E (T-O•). Reação 9: A regeneração da vitamina E por Vitamina C: o radical T-O• é reduzido de volta à vitamina E (T-OH) pelo ácido ascórbico (a forma fisiológica de ascorbato é monoânion ascorbato, AscH⁻) deixando para trás o radical ascorbil (Asc•). Reação 10: A regeneração da vitamina E por GSH: o radical T-O• é reduzido pela GSH. Reação 11: A GSSG e o radical Asc• são reduzidos de volta para GSH e AscH⁻, respectivamente, pelo ácido dihidrolipóico (DHLLA), que converte-se em ácido α -lipóico (ALA). Reação 12: A regeneração do DHLLA a partir de ALA utilizando NADPH. Reação 13: radicais LOOH são reduzidas para álcoois e O₂ por GPx usando GSH como o doador de elétrons. *Processo de peroxidação lipídica:* Reação 14: radicais LOOH podem reagir rapidamente com Fe²⁺ para formar radicais lipídicos alcóxil (LO•), ou muito mais lento com Fe³⁺ para formar radicais LOO•. Reação 15: radical LO• derivado, por exemplo, a partir do ácido araquidônico, sofre reação de ciclização para formar um anel de seis membros hidroperóxido. Reação 16: anel de seis membros hidroperóxido sofre reações adicionais envolvendo β -(cisão) a partir de 4-hidroxi-nonenal. Reação 17: 4-hidroxi-nonenal é processado em um produto inócuo glutathiyil (GST, glutathione S-transferase). Reação 18: Um radical LOO• localizado na posição interna do ácido graxo pode reagir por ciclização para produzir um peróxido cíclico adjacente a um radical centrado em carbono. Reação 19: Este radical pode então ser reduzido para formar um hidroperóxido (reação não mostrada) ou pode ser submetido a uma segunda ciclização para formar um peróxido bicíclico o qual após o acoplamento com O₂ e redução produz uma molécula estruturalmente semelhante ao endoperóxido. Reação 20: composto formado é um produto intermediário para a produção de malondialdeído (MDA). Reações 21, 22, 23: MDA pode reagir com bases de DNA Citosina, Adenina, Guanina e para formar produtos M₁C, M₁A e M₁G, respectivamente.

Fonte: Adaptado de VALKO et al. 2007

O cérebro por ser metabolicamente muito ativo tem menor capacidade de regeneração celular em comparação com outros órgãos, logo acredita-se ser particularmente susceptível aos efeitos danosos do estresse oxidativo (BHAT et al. 2015).

Embora vários estudos demonstrem o potencial terapêutico da própolis, principalmente sua ação antioxidante, largamente demonstrada e justificada pela presença de flavonóides em sua composição, inclusive com estudos nos transtornos do SNC, pouco se sabe sobre as propriedades da própolis amarela, que possui baixo conteúdo de flavonóides, porém possui vários compostos terpênicos identificados. Os triterpenos presentes na própolis amarela do Mato Grosso do Sul

possuem características lipofílicas, facilitando sua passagem pela barreira hematoencefálica. Desta forma, o potencial farmacológico da própolis amarela em distúrbios do SNC foi investigado para estabelecer sua aplicação nos transtornos centrais, com ênfase nas análises comportamentais e bioquímicas.

II OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos neurocomportamentais e no estresse oxidativo em ratos tratados com extrato etanólico de própolis amarela (EEPA).

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar em ratos tratados de forma aguda com EEPA:

- A atividade locomotora espontânea através do ensaio comportamental campo aberto;
- A atividade ansiolítica através do ensaio comportamental labirinto em cruz elevado (LCE);
- A atividade antidepressiva através do ensaio comportamental nado forçado;
- A atividade mnemônica através do ensaio comportamental esQUIVA inibitória;
- Os níveis de NO através da dosagem de nitratos e nitritos, em amostras sanguíneas;
- Os níveis de MDA através dosagem de compostos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS), em amostras sanguíneas.
- A capacidade antioxidante total através do teste TEAC (Capacidade Antioxidante Trolox Equivalente), em amostras sanguíneas.
- As atividades das enzimas antioxidantes CAT e SOD, em amostras sanguíneas.

III METODOLOGIA

3 METODOLOGIA

3.1 Obtenção do extrato

Foi utilizado EEPA cedido pela Prof^a Yohandra Reyes Torres da Universidade Estadual do Centro Oeste (UNICENTRO). A própolis utilizada foi oriunda do Mato Grosso do Sul, produzida por abelhas *Apis mellifera*.

A amostra de própolis *in natura* foi conservada em freezer até o momento de sua extração. A amostra foi triturada em almofariz com pistilo e extraída por maceração em etanol P.A (BIOTEC) (1:10 m/v) por 24 horas utilizando uma incubadora (TECNAL), com 160 rpm e temperatura ambiente. Após o tempo estabelecido para a extração, a solução foi filtrada a vácuo para retirar as partes insolúveis. Em seguida, a fase hidroalcoólica foi colocada em um freezer por 24 horas. Após esse período a solução foi novamente filtrada com papel qualitativo (MACHEREY-NAGEL) para retirar as ceras. A solução extrativa foi seca por evaporação do solvente a pressão reduzida em rotaevaporador (FISATOM Mod. 752), equipado com bomba de vácuo (PRISMATEC) e banho-maria (NOVA QUÍMICA) à 50°C. O EEPA obtido foi transferido para um frasco de vidro com tampa, e armazenados na geladeira.

3.2 Medicamentos e soluções utilizadas

Os medicamentos utilizados nos experimentos foram Diazepam 5 mg/mL solução injetável (Cristália[®], Brasil), Fluoxetina 20 mg/mL solução oral (Medley[®], Brasil), Cafeína anidra (Sigma-Aldrich[®], USA).

Foi utilizada uma solução de Tween 20 5% (Tween 20-Sigma-Aldrich® USA, água destilada, cloreto de sódio).

A amostra de EEPA foi pesada e posteriormente solubilizada com solução de Tween 20 5%. Para melhor solubilização foi utilizado o aparelho Vortex por 30 minutos, obtendo-se uma solução com concentração final de 5 mg/mL.

3.3 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) da Universidade Federal do Pará (UFPA), com parecer nº BIO046-12 (ver anexo I), obedecendo aos critérios e às normas estabelecidas por Guias de Cuidados e Uso de Animais Laboratoriais.

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, 3 meses, n = 10 animais por grupo. Os animais, provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, foram mantidos em caixas de polipropileno, 5 animais por caixa, acondicionados em condições padronizadas de temperatura (24-25°C), ciclo de luz claro/escuro de 12 h, água e ração *ad libitum*.

3.4 Testes neurocomportamentais

Os experimentos comportamentais foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e Comportamento (LAFICO), da Faculdade de Farmácia, do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará (UFPA). Foram mantidas condições ideais para realização dos experimentos:

atenuação dos níveis de ruído, baixa intensidade de iluminação e temperatura controlada (24-25°C).

Uma hora antes do início dos experimentos, os animais foram conduzidos à sala de teste para aclimação e habituação.

As diferentes doses (1, 3, 10, 30 mg/Kg) do EEPA, diazepam (1 mg/Kg), fluoxetina (10 mg/Kg), cafeína (10 mg/Kg) e Tween 5% (0,1 mL/Kg) foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), de forma aguda, 30 minutos antes dos testes comportamentais. A figura 13 demonstra o desenho experimental executado na pesquisa.

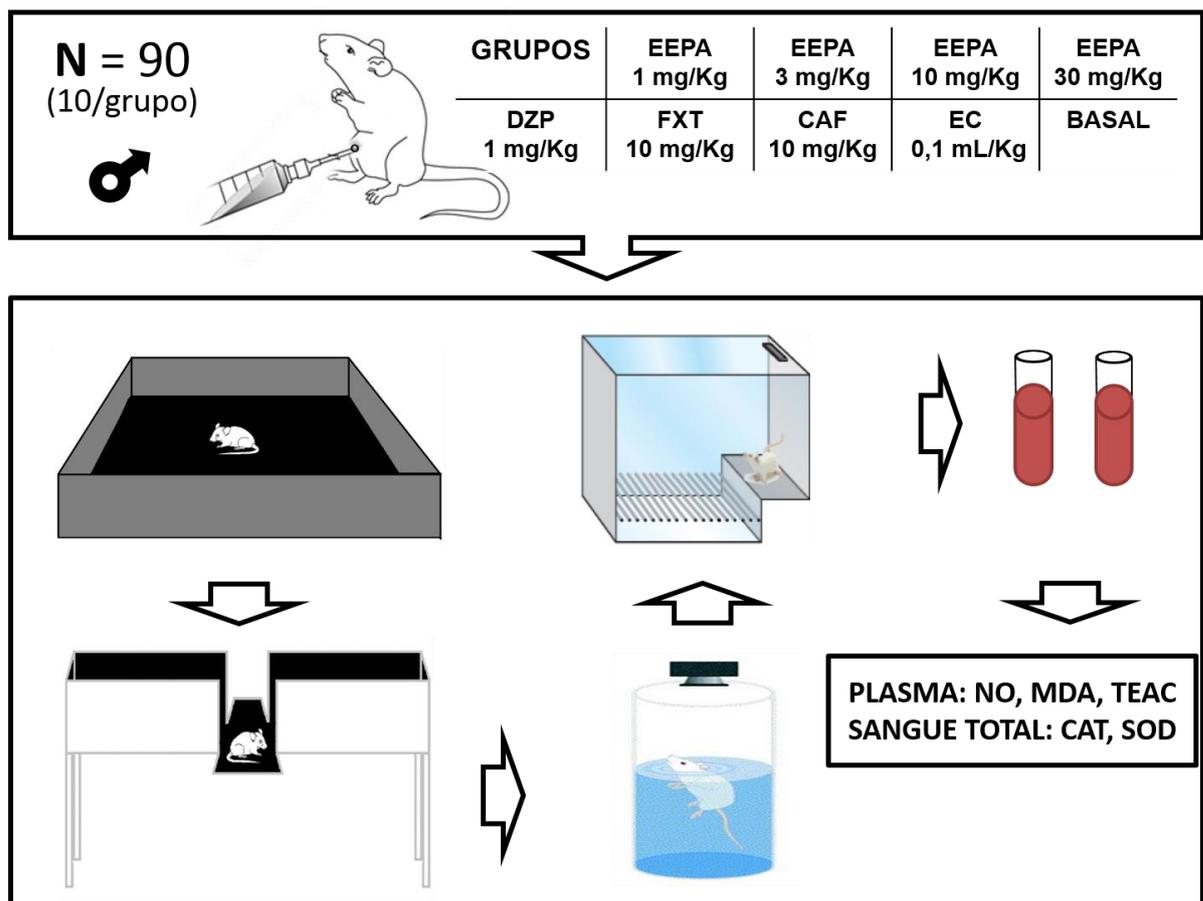


Figura 13. Esquema ilustrativo do tratamento e avaliação comportamental com EEPA. Os testes comportamentais foram realizados conforme esquema: teste do campo aberto, LCE, nado forçado e esquiva inibitória. Ao final dos testes comportamentais foi realizada a coleta de sangue e dosagem de NO, MDA, CAT, SOD e TEAC.

Para o tratamento os animais foram divididos em 9 (nove) grupos experimentais (quadro 4):

Quadro 4: Grupos experimentais, descrição e quantidade de animais por grupo.

GRUPO	DESCRIÇÃO	NÚMERO
01	Animais tratados com EEPA na dose de 1 mg/Kg i.p.	10
02	Animais tratados com EEPA na dose de 3 mg/Kg i.p.	10
03	Animais tratados com EEPA na dose de 10 mg/Kg i.p.	10
04	Animais tratados com EEPA na dose de 30 mg/Kg i.p.	10
05	EC – controle para estresse comportamental. Animais tratados com uma solução de Tween 5%, administrado na dose de 0,1 mL/Kg i.p.	10
06	DZP – controle positivo para atividade ansiolítica. Animais tratados com Diazepam na dose de 1 mg/Kg i.p.	10
07	FXT – controle positivo para efeito antidepressivo. Animais tratados com Fluoxetina na dose de 10 mg/Kg i.p.	10
08	CAF – controle positivo para comportamento mnemônico. Animais tratados com Cafeína na dose de 10 mg/Kg i.p.	10
09	BASAL – Animais que não receberam nenhum tratamento e que não foram submetidos ao protocolo de estresse comportamental.	10

Legenda: EEPA – extrato etanólico de própolis amarela; i.p. – intraperitoneal.

3.4.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

Fundamento

No teste do campo aberto, o aumento no número de linhas cruzadas indica aumento na locomoção e exploração e/ou um menor nível de ansiedade. A alta frequência do número de entradas nos quadrantes centrais e do tempo gasto na área central indica alto comportamento exploratório e baixos níveis de ansiedade (WALSH & CUMMINS, 1976).

Procedimento

No teste do campo aberto, foi utilizada uma arena em madeira (100x100x40 cm), pintada com material não permeável de cor preta, câmera filmadora e cronômetros (figura 14).

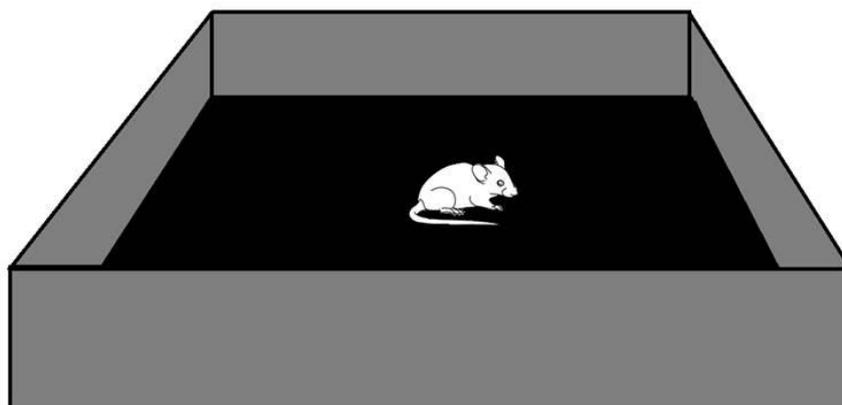


Figura 14. Diagrama esquemático do aparato utilizado no teste do campo aberto.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os animais foram colocados, individualmente, no centro do aparato e foi permitido o livre deslocamento durante 5 minutos, que foi filmado através de câmera filmadora posicionada acima da arena. Os parâmetros das filmagens foram analisados no software *Any Maze Stoelting*.

Antes e depois da exposição de cada animal, foi realizada a limpeza do aparato com álcool etílico à 10% e toalhas de papel, deixando-o secar e receber a circulação normal de ar.

Foram avaliados os parâmetros de locomoção total, locomoção central e tempo na área central.

3.4.2 TESTE DO LCE

Fundamento

Montgomery (1958) foi o primeiro a relatar que quando animais foram colocados em uma gaiola e foi dado acesso a ambos os braços, aberto e fechado, de um labirinto, eles gastaram mais tempo explorando os braços fechados.

O LCE, talvez o teste mais empregado para avaliação de ansiedade, foi proposto pela primeira vez por Handley e Mithani (1984) e validado posteriormente por File et al. (1990).

O equipamento é elevado acima do nível do chão, e é composto por dois braços fechados opostos perpendicularmente a dois braços abertos (figura 15). O teste baseia-se na tendência natural dos roedores em explorar novos ambientes e sua esquivância a lugares não protegidos, iluminados e elevados (representado pelos braços abertos). Confinamento nos braços abertos induz sinais fisiológicos de

estresse (aumento da defecação e dos níveis de corticosterona), enquanto que a exposição aos fármacos ansiolíticos clássicos, tal como benzodiazepínicos, aumenta a exploração desses braços (FILE et al. 1990).

Pellow et al. (1985) observaram que ratos confinados no braço aberto do LCE apresentaram níveis de corticosterona plasmáticos elevados em comparação com os controles, confirmando a qualidade aversiva dos braços abertos.

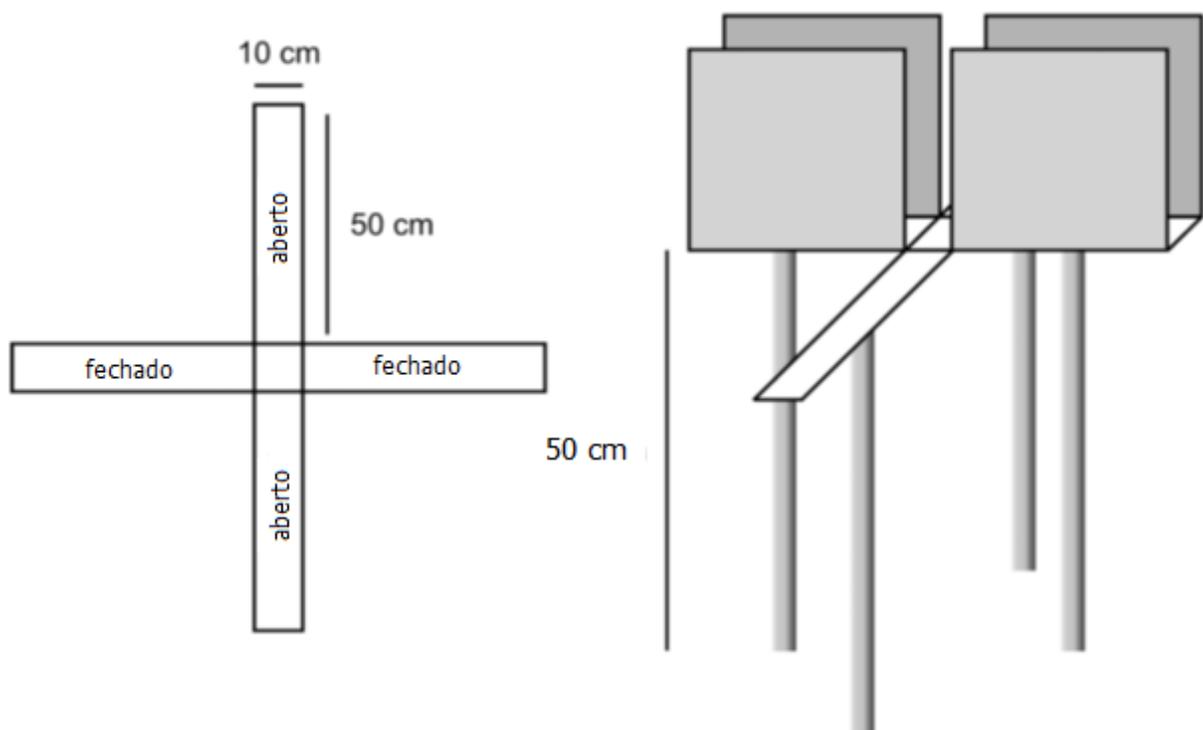


Figura 15. Diagrama esquemático do LCE.

Fonte: Adaptado de LAPIZ-BLUHM et al. 2008

Um conflito motivacional é estabelecido em que a tendência inata de ratos de explorar um ambiente novo é confrontada com seu medo inato de espaços abertos, e o comportamento do rato no aparelho representa um equilíbrio entre essas unidades opostas, cujo saldo é afetado pelo nível de ansiedade. O teste do LCE permite detectar a atividade ansiolítica/ansio gênica de uma variedade de substâncias terapêuticas e experimentais de diferentes classes. Estímulos

ansiolíticos reduzem a proporção de tempo de exploração dos braços abertos em relação ao tempo total de exploração, enquanto estímulos ansiolíticos aumentam esta proporção (LAPIZ-BLUHM et al. 2008).

A atividade basal dos animais no LCE é afetada por vários fatores, tais como condições de habitação, níveis de iluminação, variações no ciclo circadiano, manipulação prévia ou exposição ao estresse, e familiaridade com o labirinto.

Procedimento

No teste do LCE, foi utilizado um equipamento em madeira, na forma de cruz, elevado 50 cm do chão, com dois braços fechados (50x10x50 cm) e dois braços abertos (50x10 cm), opostos entre si (figura 15) (HANDLEY & MITHANI, 1984).

Após o teste do campo aberto, cada animal foi posicionado no centro do LCE, com a face voltada para um dos braços fechados, e foi permitida a exploração do equipamento durante 5 minutos.

Antes e depois da exposição de cada animal, foi realizada a limpeza do equipamento com álcool etílico à 10% e toalhas de papel, deixando-o secar e receber a circulação normal de ar.

Um observador realizou as anotações do número de entradas e do tempo de permanência dos animais nos braços abertos (EBA e TBA) e nos braços fechados (EBF e TBF). Este observador não teve conhecimento prévio a que grupo pertencia cada animal.

As percentagens de entradas nos braços abertos (%EBA) e tempo de permanência nos braços abertos (%TBA) foram calculadas de acordo com as fórmulas (PELLOW et al. 1985):

$$\%EBA = (EBA/EBA + EBF) \times 100$$

$$\%TBA = (TBA/TBA + TBF) \times 100$$

3.4.3 TESTE DO NADO FORÇADO

Fundamento

O teste de nado forçado foi desenvolvido por Porsolt et al. (1978), na *American National Standard*, com ratos e, posteriormente, com camundongos. Baseia-se na observação do comportamento de roedores quando expostos à água. Após um comportamento inicial de fuga intensa, com natação e escalada, eles param de lutar e mostram comportamento imóvel passivo. Tratamentos antidepressivos demonstram consistentemente a redução do tempo de imobilidade no teste, aumentando comportamentos ativos (SLATTERY et al. 2012).

O teste de nado forçado, devido ao seu alto rendimento, facilidade de uso, confiabilidade e especificidade, é o teste mais utilizado para avaliação de atividade antidepressiva em ratos (SLATTERY et al. 2012).

Procedimento

No teste do Nado Forçado foi utilizado um cilindro Plexiglass (30 cm de diâmetro, 50 cm de altura), contendo 40 cm de altura de água a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ (figura 16) (PORSOLT et al. 1978).

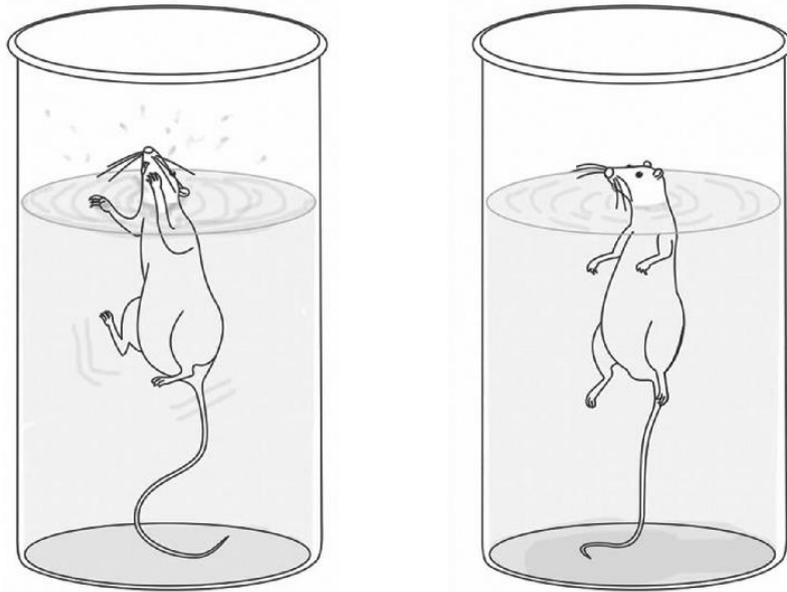


Figura 16. Diagrama esquemático de um aparelho de Nado Forçado.
Fonte: ABELAIRA et al. 2013.

Após o teste do LCE, os animais foram encaminhados para o teste do nado forçado, colocados no cilindro com água e forçados a nadar durante 5 minutos.

Foram avaliados os seguintes parâmetros (CRYAN et al. 2002):

- a) Fuga: geralmente observada nos primeiros dois minutos, considerado habituação ao teste.
- b) Imobilidade contínua: permanecer flutuando, mantendo somente os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água.
- c) Nado: circulação em todo o cilindro, nadando de um quadrante para o outro.

As avaliações foram realizadas por um experimentador que não teve conhecimento prévio a que grupo pertencia cada animal.

Ao término do teste do nado forçado, os animais permaneceram em média 30 minutos em uma caixa de polipropileno contendo maravalha, para que pudessem secar e serem encaminhados para o teste da esquiva inibitória.

3.4.4 TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA

Fundamento

Trata-se de um modelo de “condicionamento ao medo”, constituindo-se em uma tarefa na qual o indivíduo “aprende” a ter medo de um determinado estímulo. Durante o treino associa-se um contexto (uma caixa) ou um estímulo neutro (uma plataforma elevada) com a sensação de medo mediante a apresentação pareada do contexto ou estímulo neutro com outro estímulo, este aversivo (um choque elétrico). Após um número variável de sessões de treino, que pode ir de apenas uma até várias dezenas, o estímulo inicialmente neutro começa a “evocar” medo e induzir a expressão de respostas comportamentais e fisiológicas típicas desse estado. O aprendizado deste tipo de tarefa requer a integridade funcional e estrutural da amígdala e do hipocampo (CAMMAROTA et al. 2008).

Procedimento

O aparelho de esQUIVA inibitória (EP-104, Insight, Brasil) consiste em uma caixa de vidro e metal medindo 50x25x25 cm, com uma plataforma de 5 cm de altura, 7,5 cm de largura e 20 cm de comprimento (figura 17). No canto esquerdo possui uma série de barras de bronze distribuídas a uma distância de 12,5 mm entre si, que constituem o assoalho da caixa, conectadas a um estimulador elétrico.



Figura 17. Aparelho de Esquina Inibitória.

Fonte: Insight, Brasil.

O teste da esquia inibitória foi realizado após os testes do campo aberto, LCE e nado forçado. No primeiro dia os animais foram habituados ao aparato, permanecendo no interior do equipamento por 3 minutos.

No segundo dia, os animais foram tratados com EEPA, Tween 5% ou CAF, 30 minutos antes do teste. Foram cuidadosamente colocados na plataforma em frente ao canto esquerdo da caixa, com a face virada para o lado oposto do observador. Assim que o animal desceu da plataforma e colocou as quatro patas na grade, recebeu um choque de 0,4 mA por um segundo nas patas, sendo imediatamente retirado da caixa.

A memória de curta duração (MCD) foi avaliada no modelo de esquia inibitória 1,5 h após o estímulo aversivo (choque). O tempo que os animais levaram para descer com as quatro patas da plataforma foi utilizado como indicativo de retenção de memória. O intervalo de 180 segundos foi padronizado como o tempo máximo de espera para a descida do animal da plataforma durante as avaliações.

3.5 Bioquímica Oxidativa

Após realização dos testes comportamentais, os animais foram submetidos à coleta sanguínea na região intracardíaca. O sangue foi coletado, aproximadamente 2mL, em tubos de ensaio com EDTA 5%. Em seguida o sangue foi centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos para separação do plasma. O plasma foi coletado com auxílio de uma pipeta e armazenado em *ependorf* a uma temperatura de 8-10 °C. Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD foi utilizado sangue total.

Para avaliação da bioquímica oxidativa foram realizadas a avaliação dos níveis de NO através da dosagem de nitratos e nitritos, a determinação de MDA através dosagem de compostos reativos do ácido tiobarbitúrico (TBARS), a determinação da atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD e a avaliação da capacidade antioxidante através do teste do TEAC.

3.5.1 DOSAGEM DE NO

Para dosagem de NO utilizou-se o método proposto por Granger et al. (1999), baseado na reação de Griess. A reação entre nitratos e nitritos presente no soro e o reagente de Griess (sulfanilamida e N-1-naftiletilediamina) origina um cromógeno de coloração rosa, detectado por leitor de ELISA em comprimento de onda de 540 nm.

Adicionou-se o reagente de Griess na amostra em proporção 1:1 (100 µL do reagente para 100 µL da amostra), na placa de ELISA. Após 10 minutos de

adicionado o reagente, realizou-se a leitura em leitor de ELISA a 540 nm. O NO foi determinado utilizando uma curva padrão de nitrato de sódio (NaNO_2).

3.5.2 DETERMINAÇÃO DE MDA

Um dos principais aldeídos gerados com a oxidação lipídica é o MDA que pode ser dosado pela reação de TBARS, e tem sido a forma mais utilizada de avaliação da peroxidação lipídica da membrana. A dosagem de TBARS foi realizada segundo o método proposto por Kohn e Liversedge (1944), modificado por Percário et al. (1994). O princípio deste método consiste na reação de duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA) com uma molécula de MDA (que deve estar presente na amostra), formando um complexo TBA-MDA-TBA de cor rósea, detectado através de leitura espectrofotométrica na região do visível em absorbância de 535 nm.

O reagente (TBA 10 mM) foi preparado no dia da dosagem a partir 0,036 g de TBA para 25 mL da solução de Fosfato Monobásico de Potássio (KH_2PO_4) – Tampão fosfato 75 mM (pH 2,5). Adicionou-se para cada tubo de ensaio 1 mL do reagente e 0,5 mL da amostra. Em seguida os tubos foram colocados em banho-maria à temperatura de 94°C durante 1 h. Após este procedimento as amostras foram resfriadas em água corrente durante cerca de 15 minutos. Terminado o resfriamento, acrescentou-se a cada tubo de ensaio 4 mL do reagente álcool butílico. A seguir, cada um deles, individualmente, foi misturado em agitador de tubos tipo vortex, para que houvesse a máxima extração do MDA para a fase orgânica. Por fim, centrifugou-se os tubos a 2500 rpm durante 10 minutos. Pipetou-se 3 mL do sobrenadante para leitura espectrofotométrica em 535 nm. Os resultados são expressos em nmol/mL.

3.5.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Para determinação deste parâmetro foi realizado o teste TEAC (Capacidade Antioxidante Trolox Equivalente), que consiste na inibição do cátion ABTS^{•+} (radical 2,2'-azinobis-[3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico]), por antioxidantes endógenos e exógenos presentes na amostra (VASCONCELOS et al. 2007).

Os antioxidantes presentes na amostra causam uma redução na absorção proporcional à sua concentração. As capacidades antioxidantes das amostras são expressas como TEAC, utilizando uma curva de calibração traçada com diferentes quantidades de Trolox e a sua absorbância medida a 740 nm (RE et al. 1999).

A metodologia utilizada foi adaptada de Rufino et al. (2007). Inicialmente foram preparadas as seguintes soluções estoques: solução estoque ABTS^{•+} 7 mM (192 mg de ABTS em 50 mL de água destilada), solução de persulfato de potássio 140 mM (378,4 mg de persulfato de potássio em 10 mL de água destilada). O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS^{•+} com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Após este período foi preparada a solução de trabalho, diluindo-se 1 mL da solução de radical ABTS^{•+} em álcool etílico até obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm.

O procedimento consistiu em ler a absorbância em 740 nm, adicionar 20 µL da amostra, ler a absorbância em 740 nm após exatamente 3 minutos. As cubetas foram mantidas à 37°C e as leituras realizadas em espectrofotômetro com fluxo contínuo.

3.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CAT

A atividade da CAT foi determinada conforme o método descrito por Aebi (1984). As amostras sanguíneas foram hemolisadas em água gelada (1:3) para em seguida serem diluídas em tampão TRIS base (Tampão Tris 1 M/EDTA 5 mM pH 8,0). No entanto, para realizar a leitura, ou seja, verificar o decaimento do H_2O_2 , alíquotas das amostras diluídas foram adicionados a 900 μ L de solução de reação (Tampão TRIS base, peróxido de hidrogênio 30% e água ultrapura, pH 8,0), (BUKOWSKA & KOWALSKA, 2004). A diminuição da concentração de H_2O_2 foi verificada à $\lambda = 240$ nm a 25°C durante 60 segundos. A atividade de CAT foi definida como a atividade necessária para degradar 1 mol de H_2O_2 em 60 segundos, em pH 8 a 25°C, sendo expressa como U/mg proteína. O coeficiente de extinção molar H_2O_2 utilizado para o cálculo foi de 39,4 cm^2/mol . Os dados de atividade enzimática obtida no ensaio da CAT foram normalizados pelas respectivas concentrações protéicas totais, usando-se o Kit comercial Doles.

3.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD

A determinação da atividade da SOD foi realizada segundo a técnica preconizada por McCord e Fridowich (1969) adaptada. Esta metodologia é de detecção indireta da atividade da SOD, pois, a presença desta enzima na amostra, promove a conversão do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e O_2 , impedindo conseqüentemente a redução do citocromo C, que é detectada por espectrofotometria em comprimento de onda de 550 nm. A atividade da enzima SOD foi expressa em nmol/mL. Neste

ensaio, uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que promove 50% de inibição da redução do citocromo C à 25°C em pH 7,8.

3.6 Análise Estatística

Os dados dos testes comportamentais e bioquímicos foram avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via. O teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas *post hoc*. O teste t de Student foi utilizado para comparações múltiplas na dosagem de NO. Os dados de cada grupo experimental foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M) de 10 animais por grupo para os testes comportamentais e análises bioquímicas. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$. A construção gráfica e a análise estatística foram realizadas no programa *GraphPad Prism 5.0*.

IV RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Testes Neurocomportamentais

4.1.1 TESTE DO CAMPO ABERTO

Analisando o parâmetro de locomoção total (figura 18), os animais tratados com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) não apresentaram diferenças em relação ao grupo EC. Observou-se diminuição da locomoção nas doses de 1 e 30 mg/Kg em comparação ao grupo DZP. Houve aumento na locomoção do grupo DZP em comparação ao grupo controle EC.

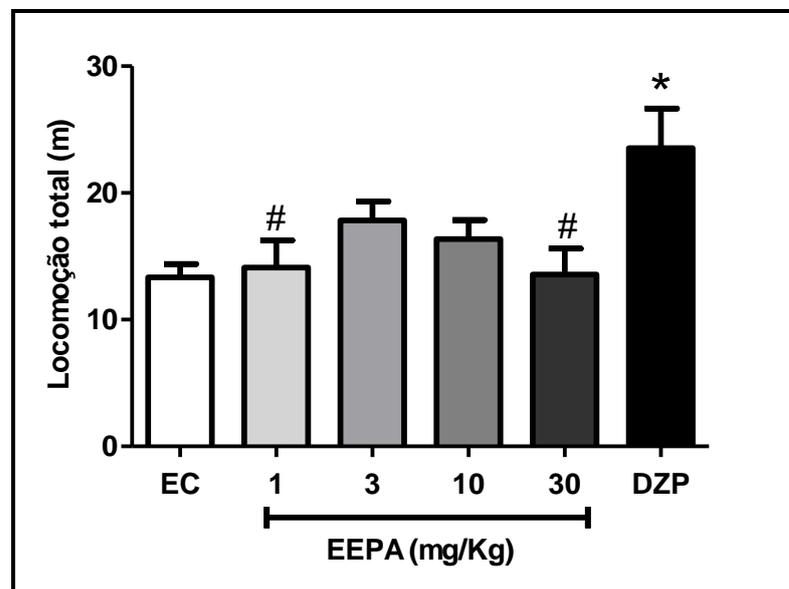


Figura 18. Efeito do tratamento com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg no parâmetro locomoção total em metros, no teste do campo aberto. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo EC; # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo DZP. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

Analisando o parâmetro de locomoção central (figura 19A), que é considerado um parâmetro de ansiedade, observou-se que os animais tratados com EEPA nas doses de 3, 10 e 30 mg/Kg aumentaram a deambulação na área central em comparação ao grupo EC, que indica atividade ansiolítica, semelhante ao grupo DZP. Com relação ao tempo na área central (figura 19B), os animais tratados com EEPA na dose de 30 mg/Kg permaneceram mais tempo na área central em relação ao grupo EC, semelhante ao grupo DZP, demonstrando novamente atividade ansiolítica do extrato.

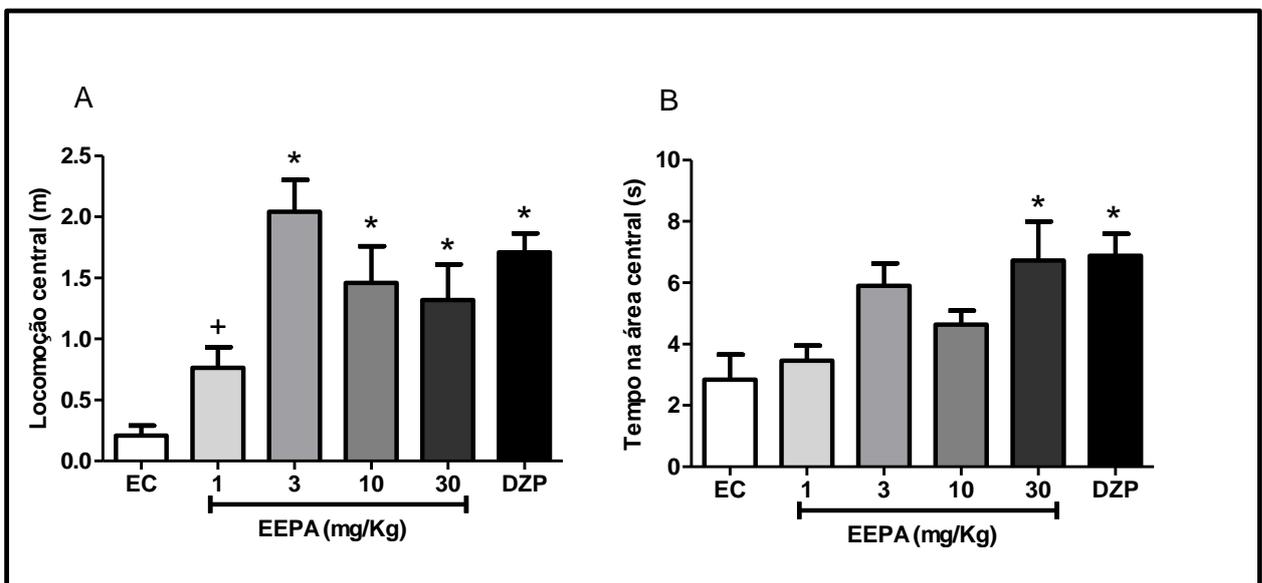


Figura 19. Efeito do tratamento com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg nos parâmetros: locomoção central em metros (**A**) e tempo na área central em segundos (**B**), no teste do campo aberto. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo EC; * $p < 0,05$ diferença significativa em relação à dose de 3 mg/Kg. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

4.1.2 TESTE DO LCE

Quanto aos efeitos ansiolíticos no parâmetro de porcentagem de entrada nos braços abertos (% EBA) no LCE (figura 20A), observou-se aumento no percentual de entrada nos braços abertos dos grupos tratados com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg), comparado ao grupo EC, semelhante ao grupo DZP. Analisando o parâmetro de porcentagem de tempo nos braços abertos (% TBA) (figura 20B) observou-se aumento no tempo de permanência no braço aberto nos grupos tratados com EEPA nas doses de 3, 10 e 30 mg/Kg em comparação ao grupo EC. Os animais tratados com EEPA na dose de 3 mg/Kg aumentaram a porcentagem de tempo nos braços abertos quando comparados com a dose de 1 mg/Kg.

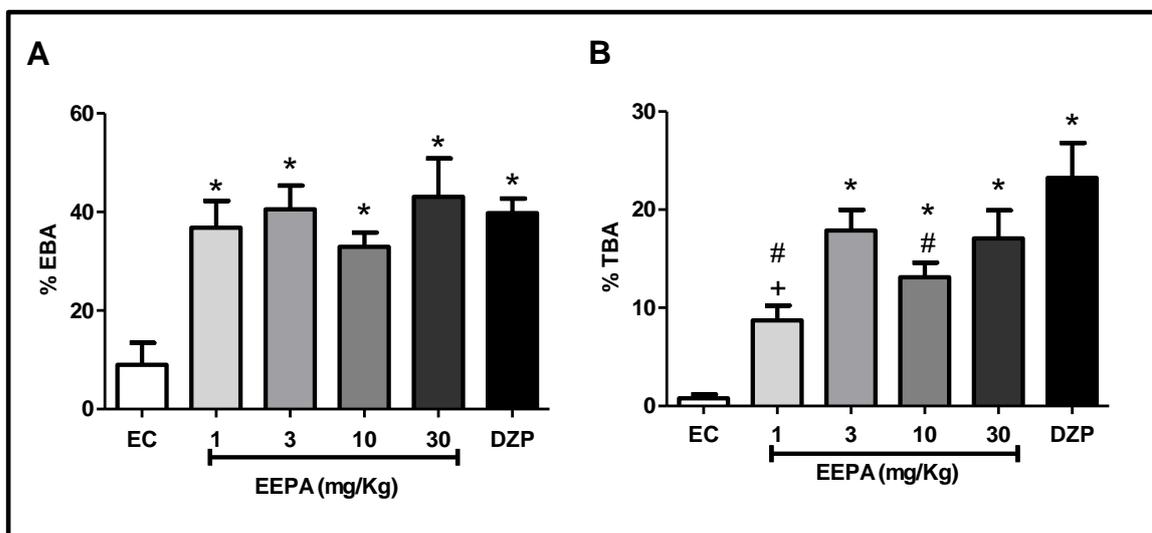


Figura 20. Efeito do tratamento com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg nos parâmetros: %EBA (A) e %TBA (B), no LCE. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo EC; # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo DZP; + $p < 0,05$ diferença significativa em relação à dose de 3 mg/Kg. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

Com relação ao parâmetro entrada nos braços fechados (EBF) (figura 21) não foi observado diferença entre os grupos testados, que demonstra a atividade motora não alterada dos animais.

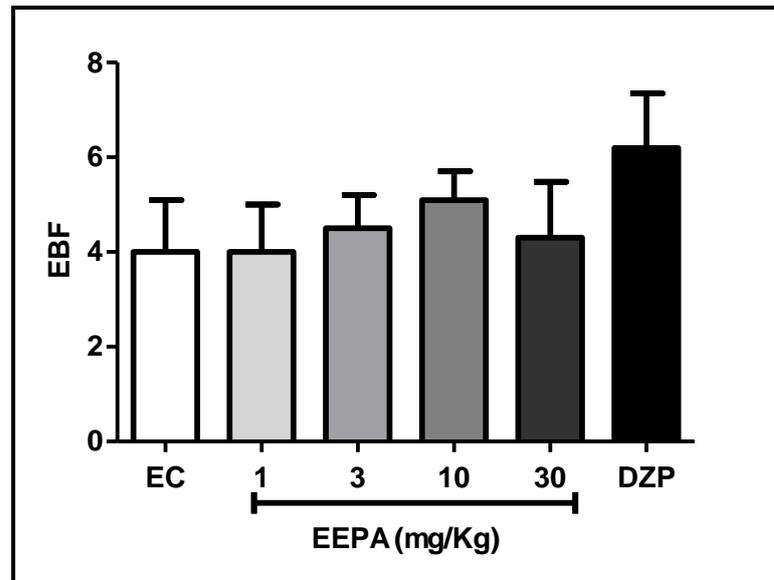


Figura 21. Efeito do tratamento com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg no parâmetro EBF, no LCE. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

4.1.3 TESTE DO NADO FORÇADO

No teste do nado forçado, quanto aos efeitos antidepressivos, observou-se diminuição do tempo de imobilidade nos grupos tratados com EEPA nas doses de 1, 3, 10, 30 mg/Kg em comparação ao grupo EC (figura 22A), demonstrando a atividade antidepressiva do extrato. Houve diminuição no tempo de imobilidade do grupo FXT em comparação ao grupo EC. Também foi observado diferença em todas as doses usadas em comparação ao grupo FXT. Em relação ao parâmetro de tempo de nado (figura 22B) não se observou diferenças entre os animais tratados com EEPA, grupo EC e grupo FXT, demonstrando atividade motora preservada entre os grupos.

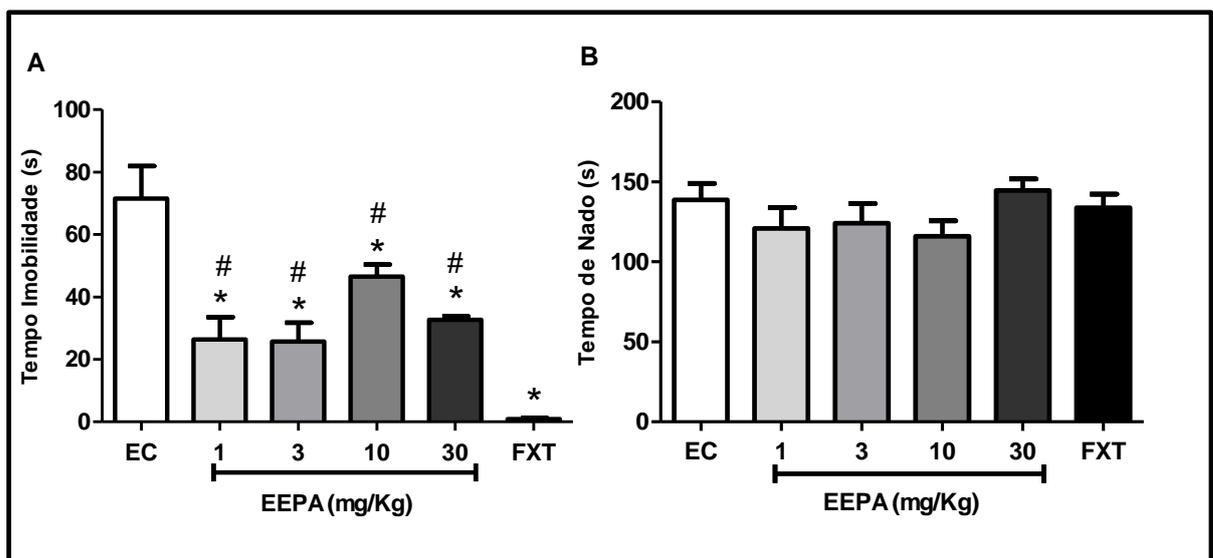


Figura 22. Efeito do tratamento com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg nos parâmetros: tempo de imobilidade em segundos (A) e tempo de nado em segundos (B), no teste do nado forçado. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo EC; # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo FXT. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

4.1.4 TESTE DA ESQUIVA INIBITÓRIA

Quanto aos efeitos mnemônicos no teste da esQUIVA INIBITÓRIA, os animais tratados com EEPA na dose de 30 mg/Kg apresentaram aumento no tempo de descida quando comparado ao grupo EC, grupo CAF e demais doses (1, 3 e 10 mg/Kg). Observou-se diminuição do tempo de descida nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg em comparação ao grupo CAF. Houve aumento no tempo de descida do grupo CAF em comparação ao grupo EC (figura 23).

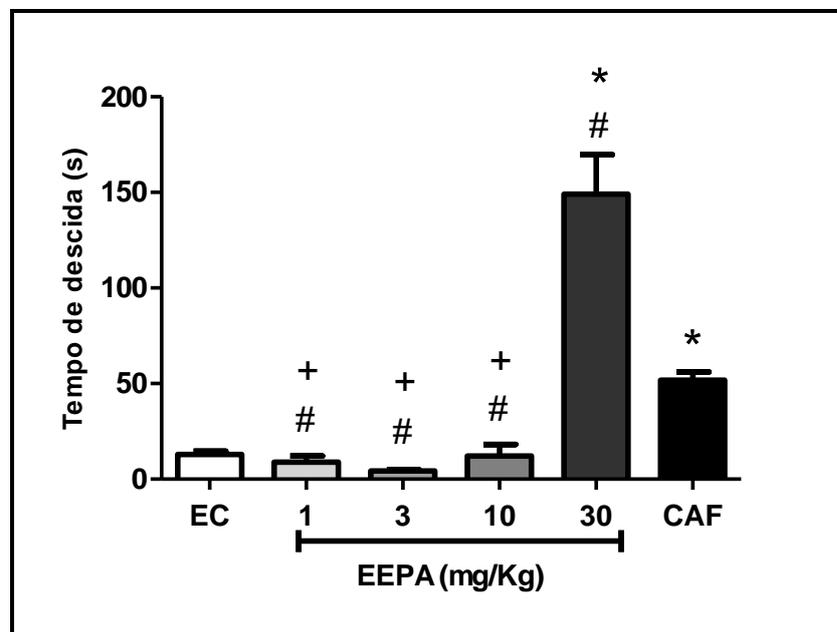


Figura 23. Efeito do tratamento com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg no parâmetro tempo de descida em segundos, no teste da esQUIVA INIBITÓRIA. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo EC; # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo CAF; + $p < 0,05$ diferença significativa em relação à dose de 30 mg/Kg. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

4.2 Bioquímica Oxidativa

4.2.1 DOSAGEM DE NO

Os resultados obtidos após tratamento agudo com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg seguido de estresse comportamental, quanto aos níveis de NO presentes no plasma, estão descritos na figura 24.

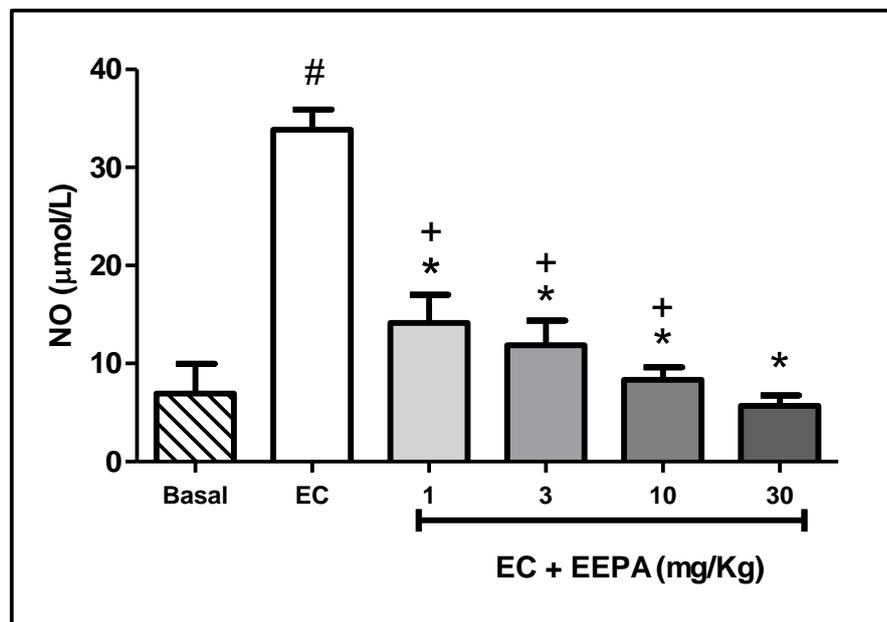


Figura 24. Concentração de NO presente nos grupos tratados com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em µmol/L. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo EC; # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo basal; + $p < 0,05$ diferença significativa em relação à dose de 30 mg/Kg. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey, teste t).

Observa-se um aumento significativo dos níveis de NO nos animais do grupo que passou somente pelo estresse comportamental (EC), quando comparados ao grupo basal, que não foi submetido ao protocolo de estresse comportamental. O tratamento com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) reverteu esse aumento, de forma dose-dependente

4.2.2 DETERMINAÇÃO DE MDA

Os resultados obtidos após tratamento agudo com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg seguido de EC, quanto às dosagens de MDA no plasma, estão descritos na figura 25.

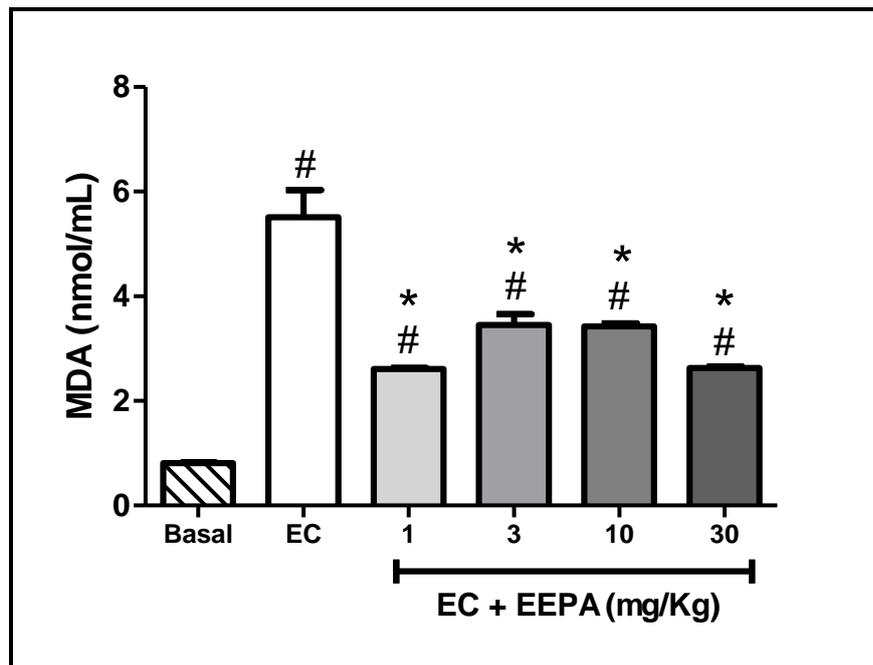


Figura 25. Determinação de MDA nos grupos tratados com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em nmol/L. * $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo EC; # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo basal. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

Os resultados demonstram um aumento significativo dos níveis de MDA nos animais do grupo EC, quando comparados ao grupo basal, animais que não passaram por testes comportamentais. O tratamento com EEPA (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) reverteu esse aumento, independente da dose.

4.2.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Os resultados obtidos após tratamento agudo com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, quanto ao TEAC, estão descritos na figura 26.

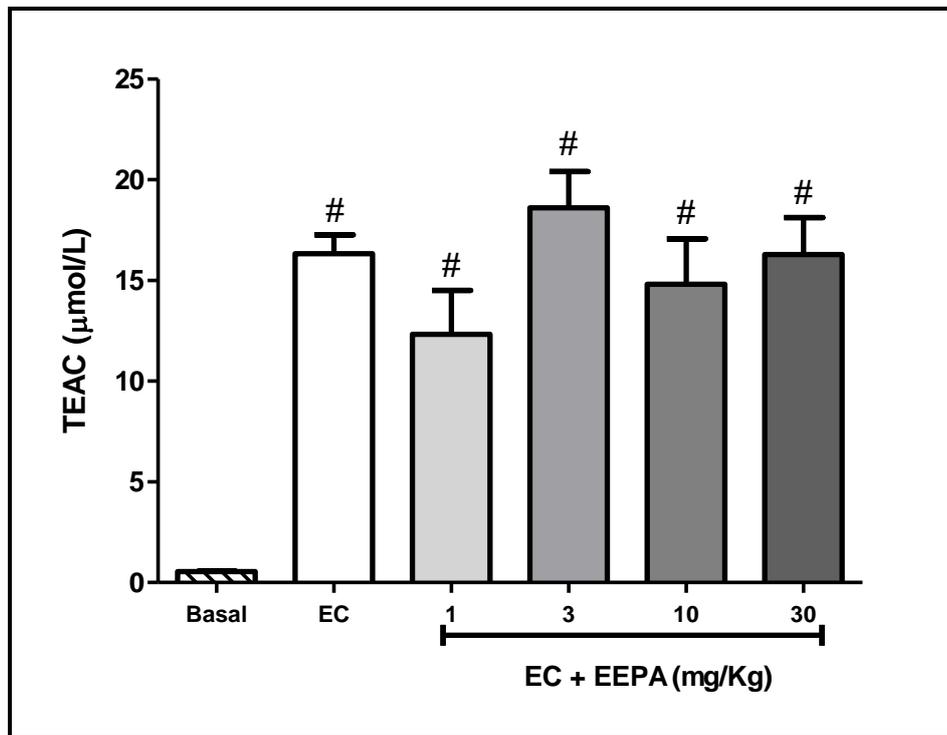


Figura 26. Dosagem de TEAC nos grupos tratados com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em $\mu\text{mol/L}$. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo basal. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

Os resultados demonstram que os animais submetidos ao EC apresentaram níveis de TEAC aumentados significativamente quando comparados ao grupo basal, animais que não passaram por testes comportamentais. Observa-se que o EEPA não alterou os níveis de antioxidantes totais induzidos pelo EC, pois os grupos tratados (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) apresentaram níveis de TEAC similares aos do grupo EC.

4.2.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CAT

Os resultados obtidos após tratamento agudo com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg seguido de EC, quanto à determinação da atividade da enzima antioxidante CAT, estão descritos na figura 27.

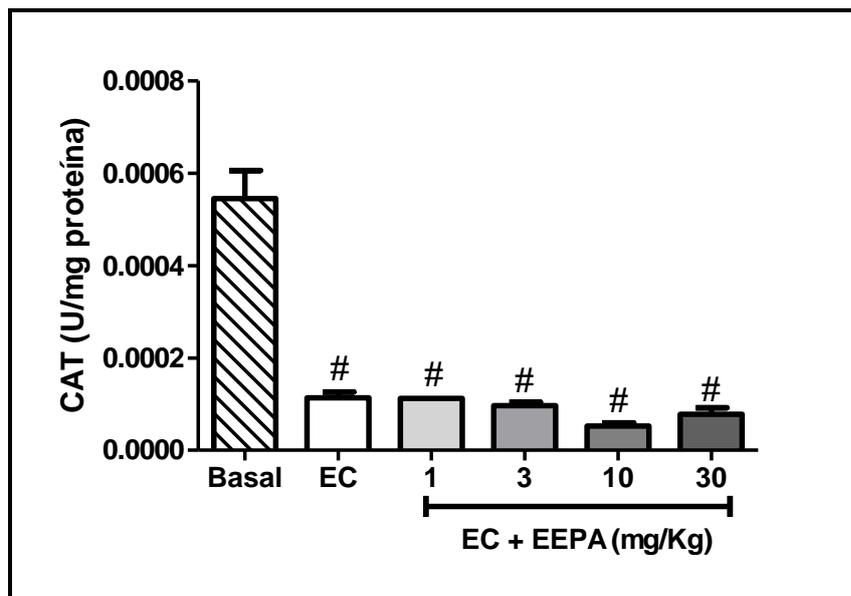


Figura 27. Determinação da atividade da CAT nos grupos tratados com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em U/mg proteína. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo basal. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

Verifica-se no gráfico que os animais submetidos ao EC apresentaram diminuição da atividade da CAT quando comparados ao grupo basal, o que não foi revertido pela administração do EEPA, em nenhuma das doses.

4.2.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD

Os resultados obtidos após tratamento agudo com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg seguido de EC, quanto à determinação da atividade da enzima antioxidante SOD, estão descritos na figura 28.

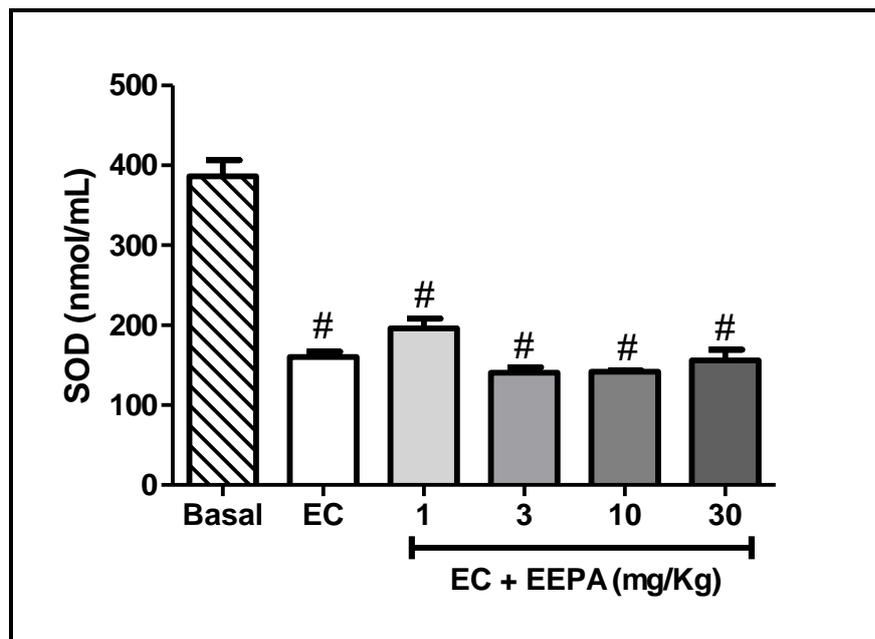


Figura 28. Determinação da atividade da SOD nos grupos tratados com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, grupo basal e grupo EC, com resultados expressos em nmol/L. # $p < 0,05$ diferença significativa em relação ao grupo basal. Os valores são expressos pela média \pm E.P.M de 10 animais por grupo (ANOVA, teste de Tukey).

Observa-se que os animais submetidos ao EC apresentaram diminuição da atividade da SOD quando comparados ao grupo basal, animais que não passaram por testes comportamentais. O EEPA não alterou a redução na atividade da SOD induzida pelo EC, pois os grupos tratados (1, 3, 10 e 30 mg/Kg) não apresentaram diferenças em relação ao grupo EC.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Este estudo investigou as possíveis atividades centrais do EEPA em ratos. Os resultados obtidos demonstraram que o EEPA apresenta atividade ansiolítica, antidepressiva, mnemônica e antioxidante, corroborando com recentes estudos de nosso grupo utilizando extrato oleoso de própolis (REIS et al. 2014).

A própolis possui um amplo espectro de compostos que apresentam várias atividades biológicas. Recentemente, observou-se um crescente interesse na sua utilização pelas indústrias farmacêutica, de cosméticos e alimentos (DALEPRANE et al. 2013).

As propriedades farmacológicas da própolis são principalmente atribuídas à presença de flavonóides. O amplo espectro de atividades biológicas dos flavonóides está relacionado principalmente a sua atividade antioxidante. De fato, esta classe de substâncias tem demonstrado interferir não apenas na propagação da reação, mas também na formação de radicais livres, tanto quelando os metais de transição quanto pela inibição de enzimas envolvidas na inicialização da reação (RUSSO et al. 2002).

Os flavonóides dihidrokaempferida, kaempferida e isosakuranetin são os constituintes principais do extrato oleoso de própolis, que apresentou atividade ansiolítica e antidepressiva. Além de ácidos fenólicos prenilados como Artepelin C (REIS et al. 2014).

Além dos flavonóides, vários outros compostos foram identificados nos diversos tipos de própolis brasileira, tais como ácidos p-cumárico prenilados, acetofenonas, lignanas, outros compostos fenólicos, di e triterpenos (BANKOVA et al. 2000). Na própolis amarela de diversas regiões houve predominância dos

compostos terpênicos (ALENCAR, 2002; CUESTA et al. 2007; MÁRQUEZ HERNÁNDEZ et al. 2010). Foram identificados compostos pertencentes à classe dos triterpenos na própolis amarela utilizada neste estudo (KOLC, 2014).

Plantas contendo derivados terpênicos têm sido usadas como sedativos, tranquilizantes e anticonvulsivantes. Muitos óleos voláteis, ricos em terpenos, possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva. Compostos como linalool, limoneno e citronelol possuem ação anticonvulsivante, enquanto mentol e mirceno apresentaram atividade analgésica. Muitos derivados monoterpênicos têm demonstrado atividades sobre o SNC, incluindo sedativa, antinociceptiva e antidepressiva (DE SOUZA et al. 2007; SOUSA et al. 2007; PERAZZO et al. 2008; LEITE et al. 2008).

Neste trabalho, foi investigado o efeito da administração aguda do EEPA, com o intuito de avaliar suas propriedades farmacológicas, em modelos experimentais de atividade comportamental e seus possíveis efeitos na bioquímica oxidativa, buscando comprovar suas possíveis ações mnemônicas, ansiolíticas e antidepressivas.

Neste sentido, o teste do campo aberto é um modelo experimental utilizado para avaliar a atividade locomotora em roedores (LAPA et al. 2003). A diminuição da atividade locomotora sugere um efeito sedativo, enquanto que seu aumento é um indicativo de efeito do tipo ansiolítico (DONALD et al. 1981; STERU et al. 1985).

Nos resultados observados verificou-se que a locomoção total nos grupos tratados com EEPA foi semelhante ao grupo controle, o que demonstra que o extrato não apresenta efeito sedativo.

Em um ambiente desconhecido, como o equipamento utilizado no teste do campo aberto, o animal tende a se locomover com mais frequência na periferia,

onde as paredes lhe conferem segurança (tigmotaxia), enquanto que animais tratados com drogas ansiolíticas tendem a explorar mais área central (PRUT & BELZUNG, 2003). Desta forma, observou-se que os animais tratados com EEPA a partir da dose de 3 mg/Kg aumentaram a deambulação na área central similar ao grupo DZP, sendo um indicativo de efeito do tipo ansiolítico.

Os resultados obtidos no teste do campo aberto nos permitem inferir que a atividade locomotora se manteve preservada após a administração de EEPA, logo o extrato não apresenta efeito sedativo e que a locomoção não foi um fator que influenciou os resultados dos testes que avaliaram a atividade ansiolítica, antidepressiva e mnemônica. Além de nos fornecer um indicativo de atividade ansiolítica do EEPA.

O teste do LCE é talvez o modelo experimental de ansiedade mais empregado atualmente. O teste baseia-se na tendência natural dos roedores em explorar novos ambientes e sua aversão inata aos lugares desprotegidos, iluminados e elevados (representados pelos braços abertos). A permanência nos braços abertos induz sinais fisiológicos de estresse e a exposição às drogas ansiolíticas clássicas aumenta a exploração desses braços. Estudos sugerem que a entrada nos braços fechados pode ser usada como medida de atividade locomotora, enquanto que a percentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos constituem parâmetros de ansiedade primária (CAMPOS et al. 2013).

No teste do LCE, observou-se que a partir da dose de 3 mg/Kg houve aumento dos parâmetros %EBA e %TBA, quando comparado ao grupo controle, semelhante ao grupo diazepam. Estes resultados sugerem que o EEPA apresentou um efeito do tipo ansiolítico, confirmando os resultados obtidos no teste do campo aberto. Em relação ao parâmetro de entrada nos braços fechados, os resultados

demonstraram que a capacidade deambulatória dos animais estava preservada em todos os grupos tratados, o que indica a capacidade do EEPA em reduzir a ansiedade sem causar sedação.

Estes resultados corroboram com trabalho recente de Reis et al. (2014) utilizando extrato oleoso de própolis, no qual verificaram atividade ansiolítica a partir da dose de 10 mg/Kg. Desta forma, o EEPA demonstrou maior atividade ansiolítica quando comparado ao extrato oleoso, uma vez que foram verificados efeitos ansiolíticos em doses quase três vezes mais baixas.

Os resultados comportamentais com EEPA são consistentes com estudos de compostos terpênicos, tais como o carvacrol (MELO et al. 2010), (+)-limoneno epóxido (ALMEIDA et al. 2012), linalol (LINCK et al. 2010), 1,4-cineol (GOMES et al. 2010), carvacryl acetato (PIRES et al. 2013) e fitol (COSTA et al. 2014), que também apresentaram ação ansiolítica sem alterar a atividade locomotora.

Moreira et al. (2014) mostraram um possível envolvimento dos receptores benzodiazepínicos no mecanismo de ação ansiolítico do monoterpeno (-)-myrtenol. Seus resultados demonstraram que os monoterpenos, como (-)-myrtenol podem promover a ligação do GABA à receptores na membrana dos neurônios, produzindo efeitos ansiolíticos. Assim, este monoterpeno poderia permitir um aumento na corrente iônica através dos canais de cloreto, inibindo a atividade neuronal.

Recentemente, Li et al. (2012) verificaram que o óleo essencial de própolis, cujos terpenos são os componentes principais, reverteu o comportamento ansiogênico em camundongos, e não apresentou efeito sobre a atividade locomotora, vindo corroborar com os resultados obtidos neste estudo. Estes efeitos foram acompanhados com a redução dos níveis plasmáticos de cortisol (CORT), hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de MDA, com aumento da atividade da

enzima SOD. Estes resultados sugerem que os efeitos terapêuticos do óleo de própolis sobre a ansiedade ocorrem através do antagonismo da hiperatividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal e pela estimulação da capacidade antioxidante no tecido cerebral.

Como a comorbidade entre ansiedade e depressão é uma questão notável em distúrbios do comportamento humano (ESTANISLAU et al. 2011), é de grande relevância a avaliação da atividade do tipo antidepressiva do EEPA.

O teste do nado forçado é um modelo experimental bem estabelecido para o estudo do comportamento do tipo depressivo em roedores. O tempo de imobilidade é utilizado como um índice do comportamento depressivo, e pode ser reduzido por tratamento com antidepressivos (ESTANISLAU et al. 2011).

No teste do nado forçado observou-se diminuição do tempo de imobilidade nos grupos tratados com EEPA em todas as doses testadas. Estes resultados indicam atividade do tipo antidepressiva do EEPA.

Para avaliação da atividade locomotora foi utilizado o parâmetro de tempo de nado. Os resultados demonstraram que a atividade motora dos animais estava preservada.

O EEPA apresentou atividade antidepressiva em doses a partir de 1 mg/kg, enquanto Reis et al. (2014) observaram atividade antidepressiva do extrato oleoso de própolis a partir da dose de 10 mg/kg.

Lee et al. (2013) verificaram resultados similares ao investigar a atividade antidepressiva de extrato etanólico de própolis, com decréscimo dose-dependente no tempo de imobilidade no teste de nado forçado, sem alterar a atividade motora. Análise em *western blot* revelou uma redução no receptor de glicocorticóide (GR) no hipocampo após o teste, que foi revertida pelo extrato de própolis, um dos

mecanismos terapêuticos de antidepressivos. Outros trabalhos reforçam o efeito ansiolítico do óleo essencial de própolis por meio da modulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal (LI et al. 2012; ORSATTI & SFORCIN, 2012). Altos níveis de glicocorticóides em pacientes com depressão são comumente atribuídos à desregulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-suprarrenal, possivelmente causada por redução na função do GR no hipocampo, hipotálamo e hipófise (REUL et al. 1987; TWARDOWSKA & RYBAKOWSKI, 1996; CUBAŁA & LANDOWSKI, 2006). Além disso, vários estudos têm demonstrado que os antidepressivos aumentam a expressão de GR, restaurando sua função e, assim, aliviam os sintomas depressivos (SECKL & FINK, 1992; MCQUADE & YOUNG, 2000; ANACKER et al. 2011).

As evidências experimentais e clínicas sustentam a hipótese monoaminérgica da depressão, na qual se afirma que o principal processo neuroquímico nesta desordem é a disfunção da neurotransmissão monoaminérgica com uma diminuição nas concentrações extracelulares de noradrenalina e/ou serotonina (SCHILDKRAUT, 1995), assim como estudos experimentais indicam que a hipofunção do sistema noradrenérgico está implicada na patofisiologia da depressão. Existe evidência para a participação de receptores α_1 , α_2 e β adrenérgicos no mecanismo de ação dos agentes antidepressivos (PAPP et al. 1994; LEONARD, 1997; HARKIN et al. 2000; MILLAN, 2004; WAARDE et al. 2004; DELL'OSSO et al. 2011). Por outro lado, tem sido documentado que os neurônios dopaminérgicos originários na área tegmental ventral que projetam seus nervos terminais em diferentes áreas telencefálicas, incluindo o córtex pré-frontal e o núcleo accumbens, estão envolvidos no controle do comportamento relacionado com recompensa e incentivo/motivação, que são prejudicados na depressão.

Tratamentos antidepressivos crônicos potencializam a transmissão de dopamina, e esta potencialização resulta de um aumento da sensibilidade dos receptores pós-sinápticos de dopamina (D'AQUILA et al. 2000; HOPWOOD et al. 2001).

Linalol e β -pineno são dois monoterpenos voláteis que possuem atividade do tipo antidepressiva (GUTIÉRREZ et al. 2012; COELHO et al. 2013). Gutiérrez et al. (2015) verificaram que estes monoterpenos produzem efeito antidepressivo através da interação com o sistema monoaminérgico, especificamente através da via serotoninérgica, sugerindo que atuam como agonistas dos receptores 5-HT_{1A} pós-sinápticos. Por outro lado, os receptores α_2 -adrenérgicos estariam envolvidos no mecanismo antidepressivo de linalol, que agiria, em parte, pela modulação da função adrenérgica. A atividade antidepressiva do β -pineno se deve parcialmente à sua ação sobre os receptores β -adrenérgicos. Além disso, β -pineno interage com os sistemas dopaminérgicos através de receptores D1.

Sintomas cognitivos, tais como déficits nas funções da memória executiva e declarativa, tem sido associados à depressão (KONRAD et al. 2015).

O modelo de esQUIVA INIBITÓRIA é um dos protocolos mais utilizados em relação aos testes de memória e aprendizado e consiste em inibir a exploração do ambiente pelo animal através da aplicação de choque elétrico. A diferença de tempo de descida dos ratos entre as sessões treino (descida da plataforma e choque) e teste (descida), corresponde à retenção na memória/aprendizado dos ratos quanto ao estímulo inibitório (IZQUIERDO & MEDINA, 1997).

Os animais tratados com EEPA na dose de 30 mg/Kg apresentaram aumento no tempo de descida quando comparado ao grupo controle e CAF, indicando atividade mnemônica nesta dose.

Efeitos sobre o comprometimento cognitivo (aprendizagem e memória) também foram demonstrados por Chen et al. (2008) com atenuação na amnésia induzida por escopolamina em ratos, após tratamento com um derivado de própolis solúvel em água. Além disso, observaram o efeito sobre a atividade da acetilcolinesterase, no córtex cerebral e no hipocampo. Como resultado, o derivado da própolis inibiu significativamente a atividade da acetilcolinesterase no hipocampo de ratos tratados com escopolamina.

Estudos neuroquímicos sugerem que a ACh no neocórtex e no hipocampo influenciam principalmente as funções superiores do cérebro, tais como aprendizagem e memória (FRANCIS et al., 1993). Atualmente, os fármacos usados no tratamento da doença de Alzheimer são inibidores da acetilcolinesterase, uma molécula presente na sinapse que cliva rapidamente ACh e impede sinalização neuronal. Desta forma, os inibidores da acetilcolinesterase aumentam a disponibilidade de ACh em sinapses colinérgicas (CUTLER & SRAMEK, 2001; KANG et al., 2005).

Foram também avaliados os níveis de NO, MDA, a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD e a capacidade antioxidante total, em amostras sanguíneas, como possíveis mecanismos subjacentes às suas ações no SNC.

Os resultados obtidos após tratamento agudo com EEPA nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/Kg, mostraram um aumento significativo dos níveis de NO nos animais do grupo EC, quando comparados ao grupo basal, porém o tratamento com EEPA reverteu esse aumento, de forma dose-dependente.

Liu et al. (2008) investigaram o efeito neuroprotetor *in vivo* da pinocembrina, um dos flavonóides presentes em maior concentração na própolis, utilizando um

modelo de oclusão da artéria cerebral média e reperfusão em ratos. A produção de NO foi avaliada e o tratamento com pinocembrina reduziu a produção de NO.

ERNs, representadas por radicais como NO, NO₂, ONOO⁻ contribuem para os mecanismos pró-oxidantes e dano neuronal (HALLIWELL, 2009). O glutamato estimula a produção de grandes quantidades de NO e produz o radical livre O₂^{•-} dentro da mitocôndria (HAEFLIGER et al. 1999). O NO reage com o O₂^{•-} para formar o ONOO⁻, o qual, em seguida, aciona a morte celular por apoptose (BONFOCO et al. 1995). Lipton et al. (1993) sugerem que a ação neurotóxica do NO deriva das suas reações com O₂^{•-} para formar ONOO⁻, o qual pode ser o agente neurotóxico.

Os resultados demonstram um aumento significativo dos níveis de MDA nos animais do grupo EC, quando comparados ao grupo basal, animais que não passaram por testes comportamentais. O tratamento com EEPA, em todas as doses, reverteu esse aumento.

A mesma redução foi observada por Li et al. (2012) com o óleo essencial de própolis, porém a partir da dose de 100 mg/Kg. Estudos anteriores demonstraram que o óleo essencial de própolis reduziu os níveis plasmáticos de MDA e inibiu a peroxidação lipídica (ATUNGULU et al. 2007; ATUNGULU et al. 2008). Monoterpenos, tais como (-)-mirtenol, têm demonstrado possuir atividade antioxidante *in vitro*, impedindo a peroxidação lipídica e remoção das concentrações de íons NO₂⁻ e radicais OH[•] (MOREIRA et al. 2102).

Um dos principais efeitos tóxicos do estresse oxidativo é a lesão das membranas celulares através do processo de peroxidação lipídica, que altera a fluidez e a forma da membrana. Além disso, causa a interrupção do transporte de cálcio, que é essencial para a sinalização intracelular. Peróxidos lipídicos também

podem danificar o DNA e as proteínas, sendo o MDA o produto final do processo de peroxidação (MAGDER, 2006; VALKO et al. 2007).

Danos neuronais originados em eventos agudos, tais como isquemia ou traumatismo, e em doenças neurodegenerativas crônicas, tais como doença de Alzheimer, doença de Parkinson e doença de Huntington, têm sido largamente descritos ocorrendo através da apoptose. Este processo envolve a ativação de uma cascata de caspases, que pode ser desencadeada por vias extrínsecas ou intrínsecas, esta última em grande parte envolvendo disfunção mitocondrial e a liberação de proteínas pró-apoptóticas. Além disso, a apoptose tem sido relacionada ao estresse oxidativo através do aumento da produção de EROs (CARDOSO et al. 2011). Um aumento do nível de EROs danifica as membranas celulares e outras estruturas celulares, perturba a função mitocondrial e conduz à liberação de citocromo C mitocondrial e ativação de vias apoptóticas (MENG et al. 2014).

Em relação a atividade das enzimas antioxidantes CAT e SOD observou-se que os animais submetidos ao EC apresentaram diminuição da atividade da CAT e da SOD quando comparados ao grupo basal, o que não foi alterado pela administração do EEPA, em nenhuma das doses. Porém, os resultados obtidos quanto à capacidade antioxidante total demonstram que os animais submetidos ao EC apresentaram o nível de TEAC aumentado quando comparados ao grupo basal, e que o EEPA não reduziu os níveis de antioxidantes totais induzidos pelo EC, pois os grupos tratados com EEPA apresentaram níveis de TEAC similares aos do grupo EC.

A partir destes dados, pode-se sugerir que o EEPA tem efeito antioxidante *in vivo*, com envolvimento de outras enzimas ou através de mecanismos não enzimáticos, uma vez que não modificou a atividade de enzimas antioxidantes CAT

e SOD, porém reduziu a produção de espécies reativas no plasma, como o NO, e a peroxidação lipídica cujo produto principal é o MDA, sem alterar a capacidade antioxidante total. Sendo possível o envolvimento de antioxidantes não enzimáticos como a GSH, vitamina E, vitamina C e ácido lipóico, ou outras enzimas como GPx, glutathione-S-transferase e glicose-6-fosfato-desidrogenase.

Aumento dos níveis de GSH após tratamento com própolis foi observado por Fonseca e colaboradores (2011) na pele de ratos submetidos a radiação UV. Aumento de GSH, em ratos tratados com própolis, também foi observado por Baykara et al. (2015), além de aumento dos níveis de GPx, CAT e SOD, e redução de MDA.

Resultado semelhante foi mostrado por Reis et al. (2014) que demonstraram a ação antioxidante do extrato oleoso de própolis, através da redução dos níveis de NO, sem alterar a capacidade antioxidante total em ratos expostos ao estresse comportamental.

Embora várias opções de tratamento estejam disponíveis para os transtornos depressivos, de ansiedade e cognição, existe uma necessidade de novas drogas com melhor tolerabilidade e eficácia. Desta forma, estes resultados sugerem que a própolis amarela surge como um potencial fármaco para o tratamento das desordens do SNC, visto que demonstrou atividade mais acentuada do que outros tipos de extrato de própolis (extrato oleoso) avaliados em trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório.

VI CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos no estudo, conclui-se que o EEPA apresentou efeitos neurocomportamentais, tais como ansiolíticos e antidepressivos, a partir da dose de 1 mg/Kg, e efeitos cognitivos em dose mais elevada, a partir de 30 mg/Kg, sem causar sedação. Sugere-se como um dos prováveis mecanismos para seus efeitos centrais, a atividade antioxidante, demonstrada pela redução da produção de espécies reativas no plasma, como o NO, e da peroxidação lipídica com a redução do MDA.

Como perspectivas futuras, são necessários estudos adicionais para avaliar as vias de sinalização que podem estar alteradas e que poderiam explicar as respostas comportamentais encontradas, bem como a identificação de possíveis efeitos tóxicos. Além disso, investigar se existe perda neuronal e se estão presentes fatores apoptóticos e/ou necróticos que possam justificar os resultados observados neste estudo.

VII REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABELAIRA, H.M.; REUS, G.Z.; QUEVEDO, J. Animal models as tools to study the pathophysiology of depression. *Rev. Bras. Psiquiatr.*, São Paulo, v. 35, supl. 2, p. S112-S120, 2013 .

ABO-SALEM, O.M.; EL-EDEL, R.H.; HARISA, G.E.I.; EL-HALAWANY, N.; GHONAIM, M.M. Experimental diabetic nephropathy can be prevented by propolis: effect on metabolic disturbances and renal oxidative parameters. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 22, nº 2, p. 205–210, 2009.

ADELMANN, J. Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2005.

AEBI, H. Catalase in vitro. In: Packer L. *Methods in Enzymology*, Vol. 105. Academic Press, Orlando, pp. 121–126, 1984.

Agência Goiana de Assistência Técnica, Extensão Rural e Pesquisa Agropecuária – EMATER. 1º Seminário Brasileiro de Própolis e Pólen. Disponível em <<http://www.emater.go.gov.br/w/2300>>. Acesso em: 22 jan, 2015.

ALENCAR, S.M. Estudo fitoquímico da origem botânica da própolis e avaliação da composição química de mel de *Apis mellifera* africanizada de diferentes regiões do Brasil. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

ALMEIDA, A.A.C.; COSTA, J.P.; DE CARVALHO, R.B.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M. Evaluation of acute toxicity of a natural compound (+)-limonene epoxide and its anxiolytic-like action, *Brain Res.* 11. 56–62, 2012.

AMAT-UR-RASOOL, H.; AHMED, M. Designing Second Generation Anti-Alzheimer Compounds as Inhibitors of Human Acetylcholinesterase: Computational Screening of Synthetic Molecules and Dietary Phytochemicals. *PLoS ONE*, 10(9), e0136509, 2015.

ANACKER, C.; ZUNSZAIN, P.A.; CATTANEO, A. et al. “Antidepressants increase human hippocampal neurogenesis by activating the glucocorticoid receptor.” *Molecular Psychiatry*, vol. 16, no. 7, pp. 738–750, 2011.

ARCHER, S. Measurement of nitric-oxide in biological models. *FASEB J.*, 7, pp. 349–360, 1993.

ATUNGULU, G.; MIURA, M.; ATUNGULU, E.; SATOU, Y.; SUZUKI, K. Activity of gaseous phase steam distilled propolis extracts on peroxidation and hydrolysis of rice lipids. *J Food Eng.* 80: 850–858, 2007.

ATUNGULU, G.; TOSHITAKA, U.; FUMIHIKO, T.; DAISUKE, H. Effect of vapors from fractionated samples of propolis on microbial and oxidation damage of rice during storage. *J Food Eng.* 88: 341–352, 2008.

BALLONE, G.J. Fisiopatologia da Depressão. In: PsiqWeb, Internet, disponível em <http://www.psiqweb.med.br/>, atualizado em 2007.

BANKOVA, V.; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G.; POPOV, S.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. *Apidologie*, v. 29, p. 361-367, 1998.

BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; MARCUCCI, M.C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, v. 70, p. 190-193, 1999a.

BANKOVA, V.; BOURDOUROVA-KRASTEVA, G.; SFORCIN, J.M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; MAIMONI-RODELLA, R.; POPOV, S. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. *Zeitschrift für Naturforschung*, v. 54 C, n. 5/6, p. 401-405, 1999b.

BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.D.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.

BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*, nº 100, p. 114–117, 2005.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. *Journal of Natural Products*, v. 29, p. 896-900, 1998.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. *Phytother. Res.*, nº 15, p. 561–571, 2001.

BARRERA, R.D.J.; ALARCÓN, E.A.; GONZÁLEZ, L.M.; VILLA, A.L.; MONTES DE CORREA, C. "Síntesis de carveol, carvona, verbenol y verbenona". *Ingeniería y Competitividad*, num. Sin mes, pp. 43-63, 2008.

BAXTER, A.J.; VOS, T.; SCOTT, K.M.; NORMAN, R.E.; FLAXMAN, A.D.; BLORE, J.; WHITEFORD, H.A. The regional distribution of anxiety disorders: implications for the Global Burden of Disease Study, 2010. *International Journal of Methods in Psychiatric Research Int. J. Methods Psychiatr. Res.*, 2014.

BAYKARA, M.; SILICI, S.; ÖZÇELİK, M.; GÜLER, O.; ERDOĞAN, N.; BILGEN, M. *In vivo* nephroprotective efficacy of propolis against contrast-induced nephropathy. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 21(4), 317–321, 2015.

BECKMAN, J.S.; KOPPENOL, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol*, 40: C1424-C1437, 1996.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, v.239, p. 70-76, 1996.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*, 65, pp. 1865–1874, 1999.

BERK, M.; NG, F.; DEAN, O.; DOOD, S.; BUSH, A.L. Glutathione: a novel treatment targeted in psychiatry. *Trends Pharmacol Sci*, 29, p.346-351, 2008.

BHATIA, S.P.; MCGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on myrtenol. *Food and Chemical Toxicology* 46, S237–S240, 2008.

BHAT, A.H.; DAR, K.B.; ANEES, S.; ZARGAR, M.A.; MASOOD, A.; SOFI, M.A.; GANIE, S.A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy* Volume 74, Pages 101–110, August 2015.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16), 7162–7166, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 3, de 19 de janeiro de 2001. Aprova os regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis, conforme consta dos Anexos desta Instrução Normativa. Disponível em: <http://http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acessado em 04 de novembro de 2015.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*, v.152, p.73–84, 2004.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, v. 36, p. 347-363, 1998.

CAMMAROTA, M. et al. Inhibition of mRNA and protein synthesis in the CA1 region of the dorsal hippocampus blocks reinstatement of a conditioned fear response. *J. Neurosci.*, v.23, p.737-41, 2003.

CAMMAROTA, M.; BEVILAQUA, L.R.M.; IZQUIERDO, I. Aprendizado e Memória. In: LENT, R. *Neurociência da Mente e do Comportamento*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Capítulo 11, p. 241-252, 2008.

CAMPOS, A.C; FOGAÇA, M.V.; AGUIAR, D.C.; GUIMARÃES, F.S. Animal models of anxiety disorders and stress. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, nº 35, p. 101–111, 2013.

CARDOSO, S.M.; RIBEIRO, M.; FERREIRA, I.L.; REGO, A.C. Northeast Portuguese propolis protects against staurosporine and hydrogen peroxide-induced neurotoxicity in primary cortical neurons. *Food and Chemical Toxicology* 49, 2862–2868, 2011.

CARVALHO, A.A.; FINGER, D.; MACHADO, C.S.; SCHMID, E.M.; COSTA, P.M.; ALVES, A.P.G.N.; MORAIS, T.M.F.; QUEIROZ, M.G.R.; QUINÁIA, S.P.; ROSA, M.R.; SANTOS, J.M.T.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; LOTUFO, L.V.C.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N.; TORRES, Y.R. In vivo antitumoural activity and composition of an oil extract of Brazilian propolis. *Food Chem.* 126, 1239–1245, 2011.

CHEN, J.; LONG, Y.; HAN, M.; WANG, T.; CHEN, Q.; WANG, R. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 90, p.441–446, 2008.

CHUGH, Y.; SAHA, N.; SANKARANARAYANAN, A.; SHARMA, P.L. Effect of peripheral administration of cinnarizine and verapamil on the abstinence syndrome in diazepam-dependent rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 106, p.127-130, 1992.
COELHO, V.; MARTINS, L.M.; MARTINS, D.F.; SANTOS, A.R.; BRUM, L.F.S.; PICADA, J.N.; PEREIRA, P. Neurobehavioral and genotoxic evaluation of (-)-linalool in mice, *J. Nat. Med.* 67. 876–880, 2013.

COSTA, J.P.; OLIVEIRA, G.A.L.; ALMEIDA, A.A.C.; SOUSA, D.P.; ISLAM, M.T.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of phytol: possible involvement of GABAergic transmission, *Brain Res.* 14. 34–42, 2014.

CRUZ, A.P.M.; ZANGROSSI, H.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. *Psicol Teor Pesq.* 13(3), p. 269-78, 1997.

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

CUBAŁA, W.J.; LANDOWSKI, J. "Serotonergic system and limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis (LHPA axis) in depression." *Psychiatria Polska*, vol. 40, no. 3, pp. 415–430, 2006.

CUESTA, O.; PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical characterization of cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow cuban varieties of propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 7502-7509; 2007.

CUTLER, N.R.; SRAMEK, J.J. Review of the next generation of Alzheimer's disease therapeutics: challenges for drug development. *Prog Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry.* 25:27–57, 2001.

D'AQUILA, P.S.; PEANA, A.T.; CARBONI, V.; SERRA, G. Exploratory behaviour and grooming after repeated restraint and chronic mild stress: effect of desipramine, *Eur. J. Pharmacol.* 399. 43–47, 2000.

DALEPRANE, J.B.; ABD, D.S. Emerging Roles of Propolis: Antioxidant, Cardioprotective, and Antiangiogenic Actions. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2013.

DAUGSCH, A.; MORAES, C.S.; FORT, P.; PARK, Y.K. "Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin." Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 5, no. 4, pp. 435–441, 2008.

DE SOUZA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; ALMEIDA, R.N. Influence of the chirality of (R)-(-)- and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: a comparative study. Chirality, 19, p.264-268, 2007.

DELL'OSSO, B.; PALAZZO, M.C.; OLDANI, L.; ALTAMURA, A.C. The noradrenergic action in antidepressant treatments: pharmacological and clinical aspects, CNS Neurosci. Ther. 17. 723–732, 2011.

DEVASAGAYAM, T.P.; KAMAT, J.P.; MOHAN, H.; KESAVAN, P.C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. Biochim. Biophys. Acta, 1282, pp. 63–70, 1996.

DIAS, B.G.; BANERJEE, S.B.; GOODMAN, J.V.; RESSLER, K.J. Towards new approaches to disorders of fear and anxiety. Curr Opin Neurobiol. 23(3), p. 346–352, June, 2013.

DUTTA A.; MCKIE, S.; DEAKIN, J.F. Ketamine and other potential glutamate antidepressants. Psychiatry Res., 30; 225(1-2), p.1-13, Jan, 2015.

ESTANISLAU, C.; RAMOS, A.C.; FERRARESI, P.D.; COSTA, N.F.; CARVALHO, H. M.C.P.; BATISTELA, S. Individual differences in the elevated plus-maze and the forced swim test. Behavioural Processes, nº 86, p. 46–51, 2011.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A. A. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. Frontiers in Bioscience E4, p. 779-793, January 1, 2012.

FERNANDES, F.H.; GUTERRES, Z.R.; GARCEZ, W.S.; CORSINO, J.; GARCEZ, F.R. Constituintes voláteis e avaliação genotóxica da própolis do Cerrado Sulmatogrossense em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. 35a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. 2012.

FILE, S.E; MABBUTT, P.S.; HITCHCOTT, P.K. Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. Psychopharmacology (Berl), 102, p. 98-101, 1990.

FISCHER, G.; CONCEIÇÃO, F.R.; LEITE, F.P.L. et al. Immunomodulation produced by a green propolis extract on humoral and cellular responses of mice immunized with SuHV-1. Vaccine, vol. 25, no. 7, p. 1250-1256, 2007.

FONSECA, Y.M.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; VICENTINI, F.T.M.C.; FURTADO, N.A.J.C.; SOUSA, J.P.B.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of

the Potential of Brazilian Propolis against UV-Induced Oxidative Stress. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Volume 2011.

FRANCIS, P.T.; WEBSTER, M.T.; CHESSELL, I.P.; HOLMES, C.; STRATMANN, G.C.; PROCTER, A.W. et al. Neurotransmitters and second messengers in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 695:19, 1993.

FURINI, C.R.G.; MYSKIW, J.C.; BENETTI, F.; IZQUIERDO, I. New frontiers in the study of memory mechanisms. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 35, p. 173–177, 2013.

FURMARK, T. Neurobiological Aspects of Social Anxiety Disorder. *Isr J Psychiatry Relat Sci*, Vol 46, No. 1, p. 5-12, 2009.

GHAFOURIFAR, P.; CADENAS, E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol. Sci.*, 26, pp. 190–195, 2005.

GOMES, P.B.; FEITOSA, M.L.; SILVA, M.I.; NORONHA, E.C.; MOURA, B.A.; VENÂNCIO, E.T.; RIOS, E.R.; DE SOUSA, D.P.; DE VASCONCELOS, S.M.; FONTELES, M.M.; DE SOUSA, F.C. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 96. 287–293, 2010.

GRANGER, D.L.; ANSTEY, N.M.; MILLER, W.C.; WEINBERG, J.B. Measuring nitric oxide production in human clinical studies. *Methods in Enzymology* 301, 49–61, 1999.

GUTIÉRREZ, S.L.G.; CANSINO, R.G.; ZEBADUA, J.C.G.; PEREZ, N.C.J.; CHILPA, R.R. Antidepressant activity of *Litsea glaucescens* essential oil: identification of beta-pinene and linalool as active principles, *J. Ethnopharmacol.* 143. 673–679, 2012.

GUTIÉRREZ, S.L.G.; JAIME, H.B.; CANSINO, R.G.; CHILPA, R.R. Linalool and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway. *Life Sciences* 128. 24–29, 2015.

HAEFLIGER, I.O.; LIETZ, A.; GRIESSER, S.M.; ULRICH, A.; SCHOTZAU, A.; HENDRICKSON, P.; FLAMMER, J. Modulation of Heidelberg retinal flowmeter parameter flow at the papilla of healthy subjects: effect of carbogen, oxygen, high intraocular pressure, and beta-blockers. *Survey of Ophthalmology* 43 (Suppl 1), S59–S65, 1999.

HAJIRAHIMKHAN, A.; DIETZ, B.M.; BOLTON, J.L. Botanical modulation of menopausal symptoms: Mechanisms of action? *Planta Medica*, 79(7), 538–553, 2013.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? *J. Neurochem.* 97(6), p.1634-1658, Jun, 2006.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med*, 46, p.531-42, 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals in Biology and Medicine. New York: Oxford University Press, 2007.

HANDLEY SL, MITHANI S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 327, p.1-5, 1984.

HARKIN, A.; NALLY, R.; KELLY, J.P.; LEONARD, B.E. Effects of reboxetine and sertraline treatments alone and in combination on the binding properties of cortical NMDA and beta1-adrenergic receptors in an animal model of depression, *J. Neural Transm.* 107. 1213–1227, 2000.

HASHIMOTO, K. Emerging role of glutamate in the pathophysiology of major depressive disorder. *Brain Res Rev.*, 61(2), p. 105-23, Oct, 2009.

HASHIMOTO, K. The role of glutamate on the action of antidepressants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*.15; 35(7), p.1558-68, Aug 2011.

HASHIMOTO, K. Therapeutic implications for NMDA receptors in mood disorders. *Expert Rev Neurother*.13(7), p.735-7, Jul 2013.

HASHIMOTO, K.; SAWA, A.; IYO, M. Increased levels of glutamate in brains from patients with mood disorders. *Biol Psychiatry*. 1; 62(11), p.1310-6, Dec, 2007.

HOPWOOD, S.E.; OWESSON, C.A.; CALLADO, L.F.; MCLAUGHLIN, D.P.; STAMFORD, J.A. Effects of chronic tramadol on pre- and post-synaptic measures of monoamine function, *J. Psychopharmacol.* 15. 147–153, 2001.

HU, F.; ZHU, W.; CHEN, M.; SHOU, Q.; LI, Y. Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2011.

HUANG, S.; ZHANG, C-P.; WANG, K.; LI, G. Q.; HU, F-L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19, 19610-19632, 2014.

IZQUIERDO, I. Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci.* v.29, p. 496-505, 2006.

IZQUIERDO, I.; BARROS, D.M.; MELLO E SOUZA, T.; DE SOUZA, M.M.; IZQUIERDO, L.A.; MEDINA, J.H. Mechanisms for memory types differ. *Nature*, v.393, p.635-6, 1998.

IZQUIERDO, I.; BEVILAQUA, L.R.M.; CAMMAROTA, M. A arte de esquecer. *Estud. av, São Paulo*, v.20, n.58, p. 289-296, 2006.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J.H. Memory formation: The sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to active in other brain structures. *Neurobiology of learning and Memory*, 68(3), 285-316, 1997.

JAVITT, D.C. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol Psychiatry*. 9(11), p.984-97, 979, Nov, 2004.

KANG, S.Y.; LEE, K.Y.; KOO, K.A.; YOON, J.S.; LIMA, S.W.; KIMA, Y.C. et al. ESP-102, a standardized combined extract of *Angelica gigas*, *Saururus chinensis* and *Schizandra chinensis*, significantly improved scopolamine-induced memory impairment in mice. *Life Sci*. 76:1691–705, 2005.

KOHN, H.I.; LIVERSEDGE, M. On a new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine, and menadione. *J Pharmacol Exp Ther*; v. 82, p. 292-300, 1944.

KOLC, C.S.M. Composição química de própolis amarela do Mato Grosso do Sul: Comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste (Unicentro). Paraná. Brasil, 2014.

KONRAD, C.; LOSEKAM, S.; ZAVOROTNYI, M. Cognitive deficits in unipolar major depression. *Nervenarzt.*, 86(1), p.99-115, Jan 2015.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y; BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 64, no. 3, p. 235–240, 1999.

KUROPATNICKI, A.K.; SZLISZKA, E.; KROL, W. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2013.

KWON, Y.S.; PARK, D.H.; SHIN, E.J.; KWON, M.S.; KO, K.H.; KIM, W.K.; JHOO, J.H.; JHOO, W.K.; WIE, M.B.; JUNG, B.D.; KIM, H.C. Antioxidant propolis attenuates kainate-induced neurotoxicity via adenosine A1 receptor modulation in the rat. *Neurosci Lett*, 355 (3), p. 231-5, 2004.

KWON, O-Y; PARK, S-P. Depression and Anxiety in People with Epilepsy. *J Clin Neurol*, 10(3), p.175-188, 2014.

LAPIZ-BLUHM, M.D.S.; BONDI, C.O.; DOYEN, J.; RODRIGUEZ, G.; BÉDARD-ARANA, T.; MORILAK, D. A. Behavioral assays to model cognitive and affective dimensions of depression and anxiety in rats. *J Neuroendocrinol*. 20(10), p. 1115–1137, October, 2008.

LEE, B.; CHOI, E-J; LEE, E-J; HAN, S-M; HAHM, D-H; LEE, H-J; SHIM, I. The Neuroprotective Effect of Methanol Extract of Gagamjungjihwan and Fructus Euodiae on Ischemia-Induced Neuronal and Cognitive Impairment in the Rat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Volume 2011.

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.

LEITE, M.P.; FASSIN JR., J.; BAZILONI, E.M.F.; ALMEIDA, R.N.; MATTEI, R.; LEITE, J.R. Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Rev Bras Farmacogn*, 18 (Supl.), p.661-666, 2008.

LEONARD, B.E. Noradrenaline in basic models of depression, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 7. S11–S16, 1997.

LEONARDO, E.D.; HEN, R. Anxiety as a Developmental Disorder. *Neuropsychopharmacology REVIEWS*, 33, p. 134–140, 2008.

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*, 31(2), p. 157–165, 2012.

LI, Z.; AN, S.C.; LI, J.N. The interaction between gamma-aminobutyric acid and other related neurotransmitters in depression. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, 45(3), p.190-4, Jun, 2014.

LIN, S-H; LEE, L-T; YANG, Y.K. Serotonin and Mental Disorders: A Concise Review on Molecular Neuroimaging Evidence. *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 12(3), p. 196-202, 2014.

LINCK, V.M.; DA SILVA, A.L.; FIGUEIRÓ, M.; CAMARÃO, E.B.; MORENO, P.R.H.; ELISABETYSKY, E. Effects of inhaled linalool in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice, *Phytotherapy* 17. 679–683. 2010.

LIPTON, S.A.; CHOI, V.B.; PAN, Z.H.; LEI, S.Z.; CHEN, H.S.; SUCHER, N.J.; LOSCALZO, J.; SINGEL, D.J.; STAMLER, J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, 364, 626-632, 1993.

LIU, R.; GAO, M.; YANG, Z-H; DU, G-H. Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia–reperfusion both in vivo and in vitro. *Brain Research*, 1216, p.104-115, 2008.

LIU, Y.; SCHUBERT, D.R. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *Journal of Biomedical Science*, 16, 98, 2009.

LONGONE, P.; DI MICHELE, F.; D'AGATI, E.; ROMEO, E.; PASINI, A.; RUPPRECHT, R. Neurosteroids as Neuromodulators in the Treatment of Anxiety Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 2, 55, 2011.

MAGDER, S. Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life? *Critical Care*, 10:208, 2006.

MANNA, F.; EL-SHAMY, K. A.; EL-SHAIKH, K. A.; EL-KASSABY, M. Efficacy of fish liver oil and propolis as neuroprotective agents in pilocarpine epileptic rats treated with valproate. *Pathophysiology*, 18, 287–294, 2011.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, v. 26, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Química Nova*, v. 19 (5), p. 529-535, 1996.

MARCUCCI, M.C., BANKOVA, V., Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis, *Current Topics in Phytochemistry*, v. 2, p. 115-123, 1999.

MÁRQUEZ HERNÁNDEZ, I.; CUESTA, O.; FERNÁNDEZ, M.C.; PÉREZ, A.R.; PORTO, R.M.O.; PICCINELLI, A.L.; RASTRELLI, L. Studies on the Constituents of Yellow Cuban Propolis: GC-MS Determination of Triterpenoids and Flavonoids. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 4725–4730, 2010.

MCCORD, J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, v.244, n.2, p.6049-6055, 1969.

MCQUADE, R.; YOUNG, A.H. "Future therapeutic targets in mood disorders: the glucocorticoid receptor." *The British Journal of Psychiatry*, vol. 177, pp. 390–395, 2000.

MELO, F.H.; VENÂNCIO, E.T.; DE SOUSA, D.P.; FONTELES, M.M.F.; DE VASCONCELOS, S.M.; VIANA, G.S.; DE SOUSA, F.C. Anxiolytic-like effect of carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 24. 437–443, 2010.

MENG, F.; WANG, Y.; LIU, R.; GAO, M.; DU, G. Pinocembrin alleviates memory impairment in transient global cerebral ischemic rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 8:1285-1290, 2014.

MILLAN, M.J. The role of monoamines in the actions of established and "novel" antidepressant agents: a critical review, *Eur. J. Pharmacol.* 500. 371–384, 2004.

MIYAMOTO, M.; UEDA, S.; HASHIMOTO, T.; KURIYAMA, K. Ischemic neuronal injury in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia: evaluation using in vivo microdialysis. *Brain Research*, vol. 543, pp. 236–242, 1991.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel-stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol.*, 48, p. 254–260, 1958.

MOREIRA, M.R.C.; COSTA, J.P.; ALMEIDA, A.A.C.; DE SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M.; ALMEIDA, R.N. Anxiolytic and antioxidant potential of MYR11: support for the development of pharmaceutical formulations, in: 4^o. Brazilian Congress of Biotechnology (IV CBBIOTEC), Guarujá, SP, 2012.

MOREIRA, M.R.C.; SALVADORI, M.G.S.S.; ALMEIDA, A.A.C.; DE SOUSA, D.P.; JORDÁN, J.; SATYALF, P.; DE FREITAS, R.M.; DE ALMEIDA, R.N. Anxiolytic-like

effects and mechanism of (-)-myrtenol: A monoterpene alcohol. *Neuroscience Letters* 579. 119–124, 2014.

MORRIS, R.G.M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature*, vol. 297, no. 5868, pp. 681–683, 1982.

MULA, M.; MONACO, F. Antiepileptic drugs and psychopathology of epilepsy: an update. *Epileptic Disord*, 11, p.1-9, 2009.

MULA, M.; PINI, S.; CASSANO, G.B. The role of anticonvulsant drugs in anxiety disorders: a critical review of the evidence. *J Clin Psychopharmacol*, 27, p.263-272, 2007.

NADEL, L.; HARDT, O. Update on Memory Systems and Processes. *Neuropsychopharmacology*, 36(1), 251–273, 2011.

NAGAI, T.; SAKAI, M.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry*, v. 75, p.237-240, 2001.

NAKAJIMA, Y.; TSURUMA, K.; SHIMAZAWA, M.; MITSHIMA, S.; HARA, H. Comparison of bee products based on assays of antioxidant capacities. *BMC Complement. Altern. Med.* 9, 4, 2009.

NUNES, F.M.N.; PEREIRA, P.A.D.P.; ANDRADE, J.B.D. Reações de ozonólise de olefinas em fase gasosa. *Quím. Nova*, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 794-804, Dec 2000.

OLTON, D.S; WALKER, J.A.; GAGE, F.H. Hippocampal connections and spatial discrimination, *Brain Research*, vol. 139, no. 2, pp. 295–308, 1978.

ORSATTI, C.L.; SFORCIN, J.M. "Propolis immunomodulatory activity on TLR-2 and TLR-4 expression by chronically stressed mice." *Natural Product Research*, vol. 26, no. 5, pp. 446–453, 2012.

PAPP, M.; KLIMEK, V.; WILLNER, P. Effects of imipramine on serotonergic and betaadrenergic receptor binding in a realistic animal model of depression, *Psychopharmacology* 114. 309–314, 1994.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol.50, no.9, p.2502–2506, 2002.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plusmaze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth.*, 14, p. 149–167, 1985.

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

PERAZZO, F.F.; LIMA, L.M.; MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.E.; REHDER, V.L.G.; CARVALHO, J.C.T. Effect of *Artemisia annua* L. leaves essential oil and ethanol extract on behavioral assays. *Rev Bras Farmacogn*, 18, p.686-689, 2008.

PERCÁRIO, S. Dosagem das LDLs modificadas através da peroxidação lipídica: correlação com o risco aterogênico. *AMHFFCMSCSP*, 13(49-52):07-09, 1994.

PIERZ, K.A.; THASE, M.E.A. Review of Vilazodone, Serotonin, and Major Depressive Disorder. *The Primary Care Companion for CNS Disorders*, 16(1), 2014.

PIRES, L.F.; COSTA, L.M.; SILVA, O.A.; ALMEIDA, A.A.C.; CERQUEIRA, G.S.; SOUSA, D.P.; FREITAS, R.M. Anxiolytic-like effects of carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, in mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 112. 42–48, 2013.

PORSOLT, R.D.; ANTON, G.; BLAVET, N.; JALFRE, M. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of* 1978.

PRYOR, W.A.; SQUADRITO, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol*, 268: L699-L722, 1995.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Anti-oxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, p. 1231-1237, 1999.

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.

REUL, J.M.H.M.; VAN DEN BOSCH, F.R.; DE KLOET, E.R. "Relative occupation of type-I and type-II corticosteroid receptors in rat brain following stress and dexamethasone treatment: functional implications." *Journal of Endocrinology*, vol. 115, no. 3, pp. 459–467, 1987.

RIEDEL, W.J.; JOLLES, J. Cognition enhancers in age-related cognitive decline. *Drugs Aging*, 8, pp. 245–274, 1996.

ROSSO, A.; MOSSEY, J.; LIPPA, C. Caffeine: neuroprotective functions in cognition and Alzheimer's disease. *Am. J. Alzheimers Dis. Other Dement.* 23, pp. 417–422, 2008.

RUFINO, M.S.; ALVES, E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico, Embrapa Agroindustrial Tropical, 1-4, 2007.

RUSSO, A., LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, v. 73, p. S21-S29, 2002.

SAAD, S.F.; KHAYYAL, M.T.; ATTIA, A.S.; SAAD, E.S. Influence of certain calcium-channel blockers on some aspects of lorazepam-dependence in mice. *J Pharm Pharmacol.* 49, p.322-328, 1997.

SANT'ANNA, B.M.P.; FONTES, S.P.; PINTO, A.C.; REZENDE, C.M. Characterization of woody odorant contributors in copaiba oil (*Copaifera multijuga* Hayne). *J. Braz. Chem. Soc.* [online], vol.18, n.5, pp. 984-989, 2007.

SCHILDKRAUT, J.J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence, *J. Neuropsychiatr. Clin. Neurosci.* 7. 524–533, 1995.

SECKL, J.R.; FINK, G. "Antidepressants increase glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus in vivo." *Neuroendocrinology*, vol. 55, no. 6, pp. 621–626, 1992.

SHI, X.; DALAL, N.S.; JAIN, A.C. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food Chem. Toxicol.* 29, pp. 1–6, 1991.

SHIH, G.C.; CALKINS, D.J. Secondary neuroprotective effects of hypotensive drugs and potential mechanisms of action. *Expert Review of Ophthalmology*, 7(2), 161–175, 2012.

SKOLNICK, P.; POPIK, P.; TRULLAS, R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci.*, 30(11), p.563-9, Nov, 2009.

SLATTERY, D.A.; CRYAN, J.F. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nature Protocols*, v. 7, n^o 6, 2012.

SOLAS, M.; PUERTA, E.; RAMIREZ, M.J. Treatment options in Alzheimer's disease: the GABA story. *Curr Pharm Des*, 2015.

SOUSA, D.P.; NÓBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. *Rev Bras Farmacogn.*, 17, p.170-175, 2007.

SOUZA, R.; CARDOSO, M.; MENEZES, C.; SILVA, J.; DE SOUSA, D.; BATISTA, J. Gastroprotective activity of α -terpineol in two experimental models of gastric ulcer in rats. *DARU: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*, 19(4), 277–281, 2011.

SUBEDEE, L.; SURESH, R.N.; JAYANTHI, M.K.; KALABHARATHI, H.L.; SATISH, A.M.; PUSHPA, V.H. Preventive Role of Indian Black Pepper in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR.* 9(4): FF01-FF04, 2015.

TOKITA, K.; YAMAJI, T.; HASHIMOTO, K. Roles of glutamate signaling in preclinical and/or mechanistic models of depression. *Pharmacol Biochem Behav.* 100(4), p.688-704, Feb 2012.

TURCATEL, E.; FUNCHAL, C.S.; GOMEZ, R. Alterações Comportamentais e de Estresse Oxidativo no Sistema Nervoso Central pelo Uso de Álcool e Tabaco. *Rev Neurocienc.*, 2012.

TWARDOWSKA, K.; RYBAKOWSKI, J. "Limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis in depression (literature review)." *Psychiatria Polska*, vol. 30, no. 5, pp. 741–755, 1996.

ULLAH, F.; ALI, T.; ULLAH, N.; KIM, M.O. Caffeine prevents d-galactose-induced cognitive deficits, oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration in the adult rat brain, *Neurochemistry International*, 2015.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44–84, 2007.

VASCOVELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.; BENFATO, V.M.M.S.; KUBOTA, C.T. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para a sua determinação. *Química Nova*, v. 5, n.3, p.1323-38, 2007.

ZARATE, C. JR.; MACHADO-VIEIRA, R.; HENTER, I.; IBRAHIM, L.; DIAZGRANADOS, N.; SALVADORE, G. Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? *Harv Rev Psychiatry*. 18(5), p.293-303, Sep-Oct 2010.

ZHAO, J.-Q; WEN, Y.-F.; BHADAURIA, M. et al. Protective effects of propolis on inorganic mercury induced oxidative stress in mice. *Indian Journal of Experimental Biology*, vol. 47, nº 4, p. 264–269, 2009.

WAGH, V.D. Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, Volume 2013.

WALSH, R.N.; CUMMINS, R.A. The open-field test: a critical review. *Psychological Bulletin*, 83, p. 482-504, 1976.

WAARDE, A.V.; VAALBURG, W.; DOZE, P.; BOSKER, F.J.; ELSINGA, P.H. PET imaging of beta-adrenoceptors in human brain: a realistic goal or a mirage? *Curr. Pharm. Des.* 10. 1519–1536, 2004.

World Health Organization, Depression Fact sheet N°369 October 2012. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/en/> Acesso em 3.12.2014.

ANEXOS

**PARECER BIO046-12**

Projeto: Efeitos Comportamentais do Óleo de Própolis sobre o Sistema Nervoso Central

Coordenador: Professora. Dra. Cristiane Maia

Área Temática: Farmácia

Vigência: 03/2011 a 03/2013

Nº no CEPAE-UFGA: BIO046-12

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação é de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 02 fevereiro de 2011

Prof. Dr. Wallace Gomes Leal
Presidente CEPAE-UFGA