

# AUSÊNCIA DE EFEITOS GENOTÓXICOS DE UM EXTRATO AQUOSO DE PRÓPOLIS (EAP) EM CÉLULAS SOMÁTICAS DE *DROSOPHILA MELANOGASTER*

## ABSENCE OF GENOTOXIC EFFECTS OF A PROPOLIS WATER EXTRACT (WEP) IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* SOMATIC CELLS

Bruno Lassmar Bueno VALADARES<sup>1</sup>, Mário Antônio SPANÓ<sup>2</sup>, Júlio César NEPOMUCENO<sup>3</sup>

**RESUMO:** Própolis é o nome genérico dado à substância resinosa coletada por abelhas (*Apis mellifera*) em diferentes fontes vegetais. A própolis é usada pelas abelhas para vedar buracos em suas colméias e para eliminar invasores. Devido às suas atividades biológicas, tem sido amplamente utilizada na medicina popular. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos genotóxicos de um extrato aquoso de própolis (EAP) por meio do teste da mancha da asa de *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART). Larvas de terceiro estágio, provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) foram tratadas com diferentes concentrações ( $1,25 \times 10^{-2}$  e  $2,5 \times 10^{-2}$  g/mL) de própolis, enquanto água destilada estéril e doxorubicina (DXR) (0,1 mg/mL) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Os resultados observados em ambos cruzamentos sugerem que o EAP, pelo menos nessas condições experimentais, não é um agente genotóxico. No entanto, novos experimentos devem ser realizados para reforçar esses resultados.

**UNITERMOS:** Própolis; Teste da mancha da asa; Somatic Mutation And Recombination Test - SMART; *Drosophila melanogaster*.

### INTRODUÇÃO

Própolis é o nome genérico dado à substância resinosa coletada pelas abelhas em diferentes fontes vegetais (GHISALBERTI, 1979). É amplamente utilizada na medicina popular, pois acredita-se que própolis possa curar inflamações, doenças cardíacas, e até mesmo diabetes e câncer (MATSUSHIGE *et al.*, 1996).

Em geral, a própolis é composta de 50% de resina (compostos flavonóides e ácidos fenólicos), 30% de cêra, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de vários compostos orgânicos (PIETTA *et al.*, 2002). No entanto, a composição química e a concentração dos seus componentes dependem de vários fatores, tais como: estação do ano; vegetação existente na área de coleta e do tipo de extração utilizada (aquosa ou alcoólica) (MIDORIKAWA *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2002; PARK; IKEGAKI, 1998).

Nos extratos aquosos de própolis (EAP) são isolados constituintes polarizados, tais como ácidos fenólicos e seus ésteres (ácidos 3,4-dimetoxicinâmico; p-cumárico; cinâmico; benzóico; metil e propil p-hidroxibenzoato) (HILHORST *et al.*, 1998), enquanto nos extratos etanólicos de própolis (EEP) são isolados constituintes neutros, tais como flavonóides

(galangin, isalpinin, kaempferol, kaempferid, rhamnocitrin, rhamnetin, quercitin, pinocembrin, pinostrobin, pinobanksin e crisin) (HILHORST *et al.*, 1998; HAVSTEEN, 1983 apud NAGAI *et al.*, 2003).

Estudos realizados com EEP e seus constituintes, têm demonstrado atividade estrogênica (SONG *et al.*, 2002) e imunomodulatória (ORSOLIC; BASIC, 2002). Tanto EEP quanto EAP têm demonstrado atividade antioxidante (NAGAI *et al.*, 2003; RUSSO *et al.*, 2002); antiinflamatória (BORRELLI *et al.*, 2002; VOLPERT; ELSTNER, 1993); antiproliferativa (SUZUKI *et al.*, 2002; USIA *et al.*, 2002); e antimicrobiana (HULEIHEL; ISANU, 2002; SANTOS *et al.*, 2002). Revisões sobre composição química, propriedades biológicas, farmacológicas e terapêuticas da própolis, assim como suas perspectivas futuras, são apresentadas por Bankova *et al.* (2000), Banskota *et al.* (2001), Castaldo e Capasso (2002), Marcucci (1995, 1996), Pereira *et al.* (2002).

Estudos de genotoxicidade demonstraram que EEP (JENG *et al.*, 2000; VARANDA *et al.*, 1999) e alguns de seus componentes, tais como ácido caféico e alguns de seus ésteres (RAO *et al.*, 1992) não tiveram efeito mutagênico em *Salmonella typhimurium* e apresentaram efeito antimutagênico quando associados a mutágenos diretos e indiretos.

<sup>1</sup> Acadêmico do Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia (MG)

<sup>2</sup> Professor Titular do Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia (MG)

<sup>3</sup> Professor Adjunto do Instituto de Genética e Bioquímica – Universidade Federal de Uberlândia (MG)

Received: 13/02/03    Accept: 28/05/03

Diante da importância da própolis e de seus constituintes na medicina popular e da falta de maiores informações relacionadas à genotoxicidade / antigenotoxicidade de seus extratos, este trabalho teve como objetivo verificar os possíveis efeitos genotóxicos (mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos) de um EAP, por meio do teste da mancha da asa de *D. melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Agentes químicos

Doxorrubicina (DXR - CAS 23214-92-8), sob a forma de pó liofilizado, Eurofarma Laboratório Ltda., São Paulo (SP) Brasil, fornecida pelo Hospital do Câncer de Uberlândia (MG). Extrato aquoso de própolis (EAP), liofilizado, obtido de própolis bruta extraída de colônias de *Apis mellifera*, provenientes de uma área de cerrado (savana) próximo à cidade de Uberlândia (MG), região sudeste do Brasil, fornecida pelo Apiário Girasol, Uberlândia (MG). Ambos agentes foram suspensos em água destilada estéril no momento do uso, e os frascos revestidos com papel alumínio para evitar a fotodegradação de seus constituintes.

### Preparação do Extrato Aquoso de Própolis (EAP)

O EAP foi preparado de acordo com o método descrito por Matsushige *et al.* (1996), com modificações. Em resumo, 100g de própolis foi triturada e suspensa com 500mL de água destilada. Após 24 horas, a suspensão foi aquecida a 80°C por 2 horas, filtrada e liofilizada.

### Procedimento experimental

As linhagens mutantes de *D. melanogaster* utilizadas no presente estudo, foram mantidas em frascos de 1/4 de litro contendo meio de cultura para *Drosophila* (820mL de água, 25g de fermento biológico - *Sacharomyces cerevisiae*, 11g de ágar, 150g de banana e 1g de nipagin).

Foram realizados dois cruzamentos: 1] Cruzamento padrão (ST): fêmeas virgens da linhagem flare<sup>3</sup> (*flr*<sup>3</sup>/*In(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*) foram cruzadas com machos da linhagem multiple wing hairs (*mwh/mwh*) (GRAF *et al.*, 1984); 2] Cruzamento da alta bioativação (HB): fêmeas virgens da linhagem ORR/flare<sup>3</sup> (*ORR/ORR; flr*<sup>3</sup>/*In(3LR)TM3, ri p<sup>p</sup> sep l(3)89Aa bx<sup>34e</sup> e Bd<sup>S</sup>*) foram cruzadas com machos da linhagem multiple wing hairs (*mwh/mwh*) (GRAF; VAN SCHAİK, 1992). De ambos cruzamentos foram obtidos descendentes portadores dos genótipos marcadores trans-heterozigotos (MH) (*mwh + / + flr*<sup>3</sup>) e heterozigotos para o cromossomo balanceador TM3 (BH) (*mwh + / + TM3, Bd<sup>S</sup>*). Os descendentes MH e BH diferenciam-se fenotipicamente pela presença, nos indivíduos BH, do marcador *Bd<sup>S</sup>*, que determina um recorte na borda das asas, deixando-as com aspecto serrilhado, enquanto os adultos MH apresentam a borda da asa lisa (GRAF *et al.*, 1984).

Os ovos foram coletados por um período de 8 horas em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento suplementado com sacarose. Larvas de 3º estágio (72 ± 4 h), provenientes de ambos cruzamentos, foram lavadas com água corrente, seguida de água destilada e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Em seguida, foram submetidas a tratamento crônico (aproximadamente 48 horas) em frascos contendo 1,5g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Hikari®) e 5mL de solução aquosa de própolis, nas concentrações de 1,25 e 2,5.10<sup>-2</sup> g/mL. Como controle negativo foi utilizada água destilada estéril; e como controle positivo, 5mL de doxorrubicina (0,1mg/mL). Os tratamentos foram realizados na ausência de luz, para evitar a fotodegradação da DXR ou, ainda, de algum dos constituintes do EAP.

Os descendentes MH e BH foram coletados e conservados em etanol 70%. As asas foram extraídas em microscópio estereoscópico e montadas entre lâmina e lamínula com solução de Faure (30g de goma arábica, 20ml de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50ml de água) e analisadas quanto a ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópio óptico de luz, com aumento de 400 X. Durante a análise das lâminas foram registrados o número de manchas mutantes, assim como o tipo e tamanho das mesmas. A análise estatística foi feita de acordo com o teste do X<sup>2</sup> para proporções, bicaudal, com nível de significância: a=b=0,05 de acordo com Frei e Würigler (1988).

## RESULTADOS

Os cruzamentos ST e HB foram realizados em paralelo, de modo que as larvas obtidas de ambos cruzamentos fossem tratadas sob idênticas condições. A análise dos descendentes MH, dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações de EAP (1,25 e 2,5.10<sup>-2</sup> g/mL), DXR (0,1mg/mL) e água destilada estéril (controle negativo) estão apresentados, respectivamente, nas Tabelas 1 e 2. A Figura 1 apresenta a distribuição dos tamanhos de manchas simples (pequenas e grandes), por mosca, dos descendentes MH, dos cruzamentos ST (A) e HB (B), dos diferentes tratamentos.

As frequências de manchas mutantes (simples pequenas, simples grandes e gêmeas), assim como os totais de manchas mutantes observadas nos descendentes de ambos cruzamentos tratados com EAP (1,25 e 2,5.10<sup>-2</sup> g/mL) foram estatisticamente não significativas (a > 0,05), quando comparadas com as frequências de manchas observadas no controle negativo. No entanto, a DXR (0,1 mg/mL) aumentou de forma estatisticamente significativa as frequências de todos os tipos de manchas, em relação ao controle negativo.

**Tabela 1.** Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) tratados com diferentes concentrações (1,25 E 2,5.10<sup>-2</sup> g/mL) de extrato aquoso de própolis (EAP)

Tratamento	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				
	Número de indivíduos	Pequenas simples (1-2 células) <sup>b</sup> m=2	Grandes Simples (>2 células) <sup>b</sup> m=5	Gêmeas m=5	Total de manchas m=2
Água	20	0,55 (11)	0,10 (02)	0,05 (01)	0,70 (14)
DXR	20	2,70 (54) +	4,45 (89) +	2,90 (58) +	10,05 (201) +
EAP (g/mL)					
1,25	20	0,25 (05) -	0,10 (02) -	0,05 (01) -	0,40 (08) -
2,50	20	0,50 (10) -	0,00 (00) -	0,05 (01) -	0,55 (11) -

<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com FREI e WÜRGLER (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância:  $\pm = 2 = 0,05$ .

<sup>b</sup> Incluindo manchas simples flr<sup>3</sup> raras.

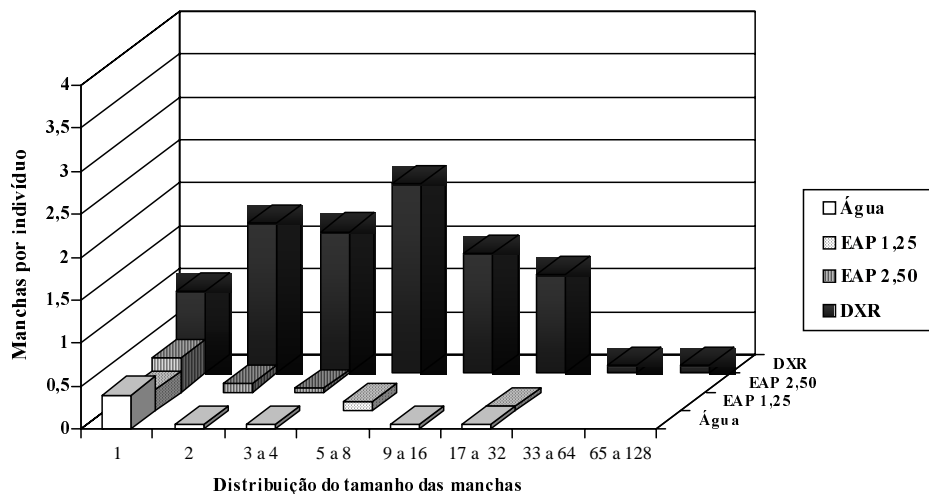
**Tabela 2.** Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *Drosophila melanogaster* do cruzamento de alta bioativação (HB) tratados com diferentes concentrações (1,25 E 2,5.10<sup>-2</sup> g/mL) de extrato aquoso de própolis (EAP)

Tratamento	Frequência de manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				
	Número de indivíduos	Pequenas simples (1-2 células) <sup>b</sup> m=2	Grandes Simples (>2 células) <sup>b</sup> m=5	Gêmeas m=5	Total de manchas m=2
Água	20	0,65 (13)	0,05 (01)	0,15 (03)	0,85 (17)
DXR	20	2,70 (54) +	3,70 (74) +	5,35 (107) +	11,75 (235) +
EAP (g/mL)					
1,25	20	1,00 (20) -	0,15 (03) -	0,10 (02) -	1,25 (25) -
2,50	20	0,55 (11) -	0,20 (04) -	0,00 (00) -	0,75 (15) -

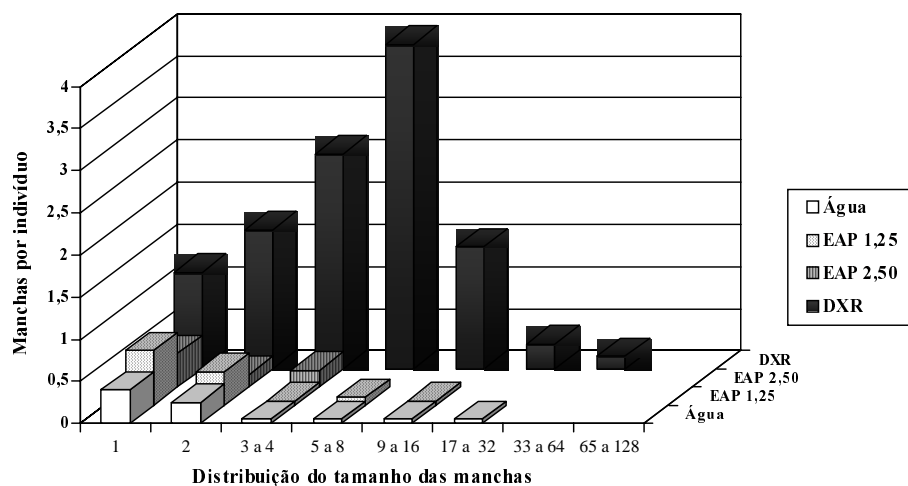
<sup>a</sup> Diagnóstico estatístico de acordo com FREI e WÜRGLER (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância:  $\pm = 2 = 0,05$ .

<sup>b</sup> Incluindo manchas simples flr<sup>3</sup> raras.

## (A) Cruzamento padrão



## (B) Cruzamento de alta bioativação



**Figura 1.** Distribuição do tamanho de manchas mutantes simples por mosca, observadas nos descendentes MH dos cruzamentos ST (A) e HB (B) tratados com água destilada estéril; EAP (1,25 e 2,50 g/mL) e DXR (0,1 mg/mL).

## DISCUSSÃO

Dos cruzamentos ST e HB foram obtidos descendentes MH e BH, identificados fenotipicamente pelas bordas das asas. As manchas mutantes observadas nos descendentes MH são devidas à ocorrência de mutações de ponto, aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas, enquanto que as obtidas nos descendentes BH devem-se apenas à ocorrência de mutações gênicas e cromossômicas, uma vez que a presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador TM3 elimina todos os produtos devidos a eventos recombinacionais (GRAF *et al.*, 1984; GRAF; VAN SCHAİK, 1992).

As frequências de todas as categorias de manchas mutantes observadas nos descendentes MH tratados com EAP foram estatisticamente não significativas em ambos cruzamentos, quando comparadas com as obtidas nos respectivos controles negativos. Desta forma, não se justifica a análise dos indivíduos BH. Esses resultados nos

permitem concluir que, nas condições experimentais empregadas, o EAP atua como um agente não mutagênico, clastogênico e/ou recombinogênico, confirmando trabalhos prévios desenvolvidos por Valadares e Spanó (1998), utilizando o teste SMART de asa e extratos de própolis dissolvida em 1% de Tween e 3% de etanol.

As frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH tratados com DXR foram estatisticamente significativas em ambos cruzamentos, o que permite afirmar que o DXR é um agente genotóxico direto, que não necessita de ativação metabólica. Mesmo sem analisar os descendentes BH, pode-se dizer que o DXR é um agente recombinogênico, devido às frequências estatisticamente significativas de manchas gêmeas observadas (originadas exclusivamente por recombinação). Esses resultados estão de acordo com os obtidos por Fragiorge (2000). De fato, a DXR é um agente antineoplásico com efeitos genotóxicos comprovados que atua tanto como

intercalante de DNA, como inibidor de topoisomerase e gerador de radicais livres (KEIZER *et al.*, 1990).

A Figura 1 mostra que os indivíduos tratados com EAP e com água destilada estéril, de ambos cruzamentos, apresentam predominância nas frequências de manchas pequenas simples; e que as manchas com tamanho maiores estão presentes em frequências decrescentes. Esses resultados estão de acordo com os observados para diferentes agentes químicos (GRAF *et al.*, 1984; SPANÓ *et al.*, 2001).

No tratamento com DXR, tanto no cruzamento ST quanto HB, observa-se uma distribuição de manchas diferente da esperada (GRAF *et al.*, 1984) para tratamentos crônicos de 48 h. Esta diferença pode ser devida ao fato de que o DXR é um agente mutagênico direto, que age imediatamente após o contato com a larva, levando à formação de manchas mutantes grandes. Resultados similares aos obtidos no presente estudo foram encontrados por Fragiorgi (2000) no tratamento de larvas de *D. melanogaster* com o DXR.

Os resultados observados neste trabalho com EAP estão de acordo com trabalhos prévios descritos na literatura com diferentes EEP e/ou com seus constituintes. De acordo com Rao *et al.* (1992), algumas atividades biológicas da própolis podem ser devidas a ésteres derivados do ácido caféico (ácido cinâmico). Esses autores, demonstraram que diferentes ésteres de ácido caféico, tais como o metil cafeato (MC), feniletil cafeato (PEC) e o feniletil dimetilcafeato (PEDMC), não apresentaram efeitos mutagênicos, com ou sem ativação por enzimas da fração microsossomal S<sub>9</sub> de fígado de rato, mas possuem atividade antimutagênica quando associados com 3,2'-dimetil-4-aminobifenil (DMAB) em linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium*.

Varanda *et al.* (1999) demonstraram que extratos

etanólicos de própolis não apresentaram efeitos mutagênicos em *S. typhimurium* (TA 98, TA 100 e TA 102), com ou sem ativação metabólica com enzimas da fração S<sub>9</sub>; mas possuem atividade antimutagênica quando associados com daunomicina (TA 102), benzo(a)pireno (TA 100) e aflatoxina B1 (TA 98).

Jeng *et al.* (2000) demonstraram que EEP não apresentaram efeitos mutagênicos em *S. typhimurium* (TA 98), com ativação metabólica com enzimas da fração S<sub>9</sub>; mas possuem atividade antimutagênica quando associados com os agentes mutagênicos 4-nitro-*O*-fenilenediamino (4-NO); 1-nitropireno (1-NP); 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina (IQ); e benzo(a)pireno (B[A]P).

Os resultados observados neste trabalho nos permitem concluir que o SMART de asas de *D. melanogaster* é eficiente na detecção de efeitos genotóxicos de agentes químicos e misturas complexas; e sugerir que o sistema enzimático citocromo P450 não interfere no potencial genotóxico do EAP de *Apis mellifera* que, nessas condições experimentais, não possui efeitos genotóxicos (mutagênicos e recombinogênicos). No entanto, novos experimentos devem ser realizados para reforçar esses resultados.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Institute of Toxicology, Swiss Federal Institute of Technology and University of Zürich, Schwerzenbach (Switzerland), e em especial ao Dr. Ulrich Graf, pelo fornecimento das linhagens mutantes e pelas facilidades concedidas para a realização deste trabalho. Ao Hospital do Câncer de Uberlândia (MG) pelo fornecimento do antitumoral cloridrato de doxorubicina e ao Apiário Girassol de Uberlândia, MG, pelo fornecimento das amostras de própolis.

---

**ABSTRACT:** Propolis is the generic name for the bee glue collected by honeybees (*Apis mellifera*) from various plant sources. Propolis is used by bees to seal holes in their hives and to eliminate outside invaders. Due to its biological activity, it has been used in folk medicine. This study evaluated the genotoxic effects of a propolis water extract (WEP) by means of the wing spot test of *Drosophila melanogaster* (Somatic Mutation And Recombination Test - SMART). Third-instar larvae derived from standard cross (ST) and high bioactivation cross (HB) were treated with different concentrations ( $1.25 \times 10^{-2}$  and  $2.5 \times 10^{-2}$  g/mL) of propolis, while distilled water and doxorubicin (DXR) (0.1 mg/mL) were used as negative and positive control, respectively. The results observed in both crosses suggest that WEP, at least in these experimental conditions, is not a genotoxic agent. Nevertheless, further experiments must be carried out to reinforce these results.

**UNITERMS:** Propolis, Wing spot test, Somatic Mutation And Recombination Test - SMART, *Drosophila melanogaster*.

---

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, Versailles, v. 31, n. 01, p. 03 – 15, Jan. – Feb. 2000.

- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 07, p. 561-571, Aug. 2001.
- BORRELLI, F.; IZZO, A. A.; DI CARLO, G.; MAFFIA, P.; RUSSO, A.; MAIELLO, F. M.; CAPASSO, F.; MASCOLO, N. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, Suppl. 01, p. S38-S43, Nov. 2002.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, Suppl. 01, p. S1-S6, Nov. 2002.
- FRAGIORGE, E. J. **Efeitos moduladores do ácido ascórbico quando associado ao cloridrato de doxorrubicina em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, tratadas na presença ou ausência de luz.** 2000. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 203, p. 297-308, 1988.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: a review. **Bee World**, Bucks, v. 60, n. 02, p. 59-84, 1979.
- GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 271, p. 59-67, 1992.
- GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, New York, v. 6, p. 153-188, 1984.
- HILHORST, M. J.; SOMSEN, G. W.; de JONG, G. J. Potential of capillary electrophoresis for the profiling of propolis. **Journal Of High Resolution Chromatography**, Heidelberg, v. 21, p. 608-612, Nov., 1998.
- HULEIHEL, M.; ISANU, V. Anti-herpes simplex virus effect of an aqueous extract of propolis. **Israel Medical Association Journal**, Tel Aviv, v. 4, n. 11, p. 923-927, Nov. 2002.
- JENG, S.-N.; SHIH, M.-K.; KAO, C.-M.; LIU, T.-Z.; CHEN, S.-C. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. **Food and Chemical Toxicology**, Elmsford, v. 38, n. 10, p. 893-897, Oct. 2000.
- KATZ, A. J.; FOLEY, T. A. Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spot assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 22, p. 54-58, 1993.
- KEIZER, H. G.; PINEDO, H. M.; SCHUURHUIS, G. J.; JOENJE, H. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 47, n. 02, p. 219-231, 1990.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, Versailles, v. 26, n. 01, p. 83-99, Jan. – Feb. 1995.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 529-536, 1996.
- MATSUSHIGE, K.; BASNET, P.; HASE, K.; KADOTA, S.; TANAKA, K.; NAMBA, T. Propolis protects pancreatic b-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). **Phytomedicine**, Jena, v. 3, p. 203-209, 1996.
- MIDORIKAWA, K.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; NAGAOKA, T.; MATSUSHIGE, K.; MESSAGE, D.; HUERTAS, A. A.; KADOTA, S. Liquid chromatography-mass spectrometry analysis of propolis. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v. 12, p. 366-373, 2001.

- NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, Oxford, v. 80, n. 01, p. 29-33, Jan. 2003.
- ORSOLIC', N.; BASIC', I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne v. 84, n. 2-3, p. 265-273, Feb. 2002.
- PARK, Y. K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 62, n. 11, p. 2230-2232, Nov. 1998.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 09, p. 2502-2506, Apr. 2002.
- PEREIRA, A. S.; SEIXAS, F. R. M. S.; AQUINO NETO, F. R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 02, p. 321-326, abr. – mai. 2002.
- PIETTA, P. G.; GARDANA, C.; PIETTA A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, Suppl. 01, p. S7-S20, Nov. 2002.
- RAO, C. V.; DESAI, D.; KAUL. B.; AMIN, S.; REDDY, B. S. Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 84, n. 03, p. 277-290, Nov. 1992.
- RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, Milan, v. 73, Suppl. 01, p.S21-S29, Nov. 2002.
- SANTOS, F. A.; BASTOS, E. M.; UZEDA, M.; CARVALHO, M. A.; FARIAS, L. M.; MOREIRA, E. S.; BRAGA, F. C. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 80, n. 01, p. 1-7, Apr. 2002.
- SONG, Y. S.; JIN, C.; JUNG, K. J.; PARK, E. H. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 82, n. 2-3, p. 89-95, Oct. 2002.
- SPANÓ, M. A.; FREI, H.; WÜRGLER, F. E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, Oxford, v.16, n. 05, p. 385-394, Sep. 2001.
- SUZUKI, I.; HAYASHI, I.; TAKAKI, T.; GROVEMAN, D. S.; FUJIMIYA, Y. Antitumor and anticytopenic effects of aqueous extracts of propolis in combination with chemotherapeutic agents. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**, Larchmont, v. 17, n. 05, p. 553-562, Oct. 2002.
- USIA, T.; BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; MIDORIKAWA, K.; MATSUSHIGE, K.; KADOTA, S. Constituents of chinese propolis and their antiproliferative activities. **Journal of Natural Products**, Columbus, v. 65, n. 05, p. 673-676, May 2002.
- VALADARES, B. L. B.; SPANÓ, M. A. Avaliação da própolis pelo teste de detecção de mutações e recombinações somáticas (SMART) em células de asa de *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 21, n. 3, p. 129, Nov. 1998. Supplement.
- VARANDA, E. A.; MONTI, R.; TAVARES, D. C. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct- and indirect-acting mutagens. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, New York, v. 19, n. 06, p. 403-413, 1999.
- VOLPERT, R.; ELSTNER, E. F. Biochemical activities of propolis extracts. II. Photodynamic activities. **Zeitschrift für Naturforschung**, Mainz, v. 48, p.858-862, 1993.