

Avaliação de atividade mutagênica de amostras de própolis vermelha do Estado de Sergipe (Brasil) pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática em *Drosophila melanogaster*

M. N. Cardoso¹; A. L. P. Santos¹; M. V. Alves¹; B. L. B. Valadares²

¹Graduandos do curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

² Professor do Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, CEP 49100-000, São Cristóvão-SE, Brasil

brunovaladares@uol.com.br

(Recebido em 19 de julho de 2014; aceito em 29 de novembro de 2014)

A própolis é uma substância resinosa coletada por abelhas (*Apis mellifera*) com finalidade de assepsia e construção de estruturas na colônia. É composta por uma mistura complexa de substâncias de origem vegetal, sendo influenciada pela flora local e época (estação do ano) de coleta. A própolis vermelha recebe essa denominação devido à sua coloração, sendo encontrada principalmente na região nordeste do Brasil. É utilizada na medicina popular, tendo diversas propriedades biológicas cientificamente comprovadas. O presente estudo foi realizado com objetivo de avaliar possíveis efeitos mutagênicos/recombinogênicos de amostras de própolis vermelha originárias do Estado de Sergipe pelo Teste de Mutação e Recombinação Somática (Somatic Mutation and Recombination Test - SMART). Larvas de *Drosophila melanogaster* de terceiro estágio, provenientes dos cruzamentos padrão (Standard cross - ST) e de alta ativação metabólica (High bioactivation cross - HB), foram tratadas com diferentes concentrações (0,125; 0,25; 0,5 mg/mL) de extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV). Como controles negativo e positivo foram utilizados, respectivamente, água destilada e uretano (URE) (0,891 mg/mL). Foram observadas as frequências de manchas de pelos mutantes nas asas dos adultos emergentes, não sendo encontrados efeitos mutagênicos e recombinogênicos de EAPV nas condições experimentais utilizadas nos descendentes de ambos os cruzamentos. Considerando a importância da própolis, devido às suas propriedades terapêuticas, novos estudos devem ser realizados em diferentes condições experimentais para reforçar esses resultados, assim como avaliar seus possíveis efeitos antimutagênicos/antirecombinogênicos.

Palavras-chave: SMART, produtos naturais, *Apis mellifera*, teste da mancha da asa.

Evaluation of the mutagenic activity of red propolis samples from Sergipe State (Brazil) by Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*

Propolis is a resinous substance collected by bees (*Apis mellifera*) with aseptic and constructive purpose in the colony. It consists of a complex mixture of substances of vegetable sources, being influenced by the local flora and season of collection. The red propolis receives this name due to its color, being found mostly in Brazilian northeast areas. It is used in folk medicine, and its biological properties are proven by scientific studies. The present study was performed to evaluate possible mutagenic/recombinogenic effects of red propolis samples from Sergipe State by Somatic Mutation and Recombination Test (SMART). Third-instar larvae of *Drosophila melanogaster* derived from standard cross (ST) and high bio-activation cross (HB) were treated with different concentrations (0.125; 0.25; 0.50 mg/mL) of red propolis water extract (EAPV). Distilled water and urethane (URE) (0.891 mg/mL) were used as negative and positive control, respectively. The frequency of mutant wing hairs spots was observed on the wings of emerging adults and not been found mutagenic and recombinogenic effects of EAPV on the experimental conditions used in the offspring of both crosses. Considering the importance of propolis because of its therapeutic properties, further studies should be carried out in different experimental conditions to strengthen these results, as well as assess its possible antimutagenic/antirecombinogenic effects.

Keywords: SMART, natural products, *Apis mellifera*, wing spot test.

1. INTRODUÇÃO

Própolis é uma mistura complexa formada por material resinoso e balsâmico de origem vegetal, coletada por abelhas de diferentes espécies, principalmente *Apis mellifera* L.¹, e modificada pela adição de secreções como saliva e cera após seu transporte para a colônia^{2,3}. Tem função de vedar, impermeabilizar e esterilizar a colmeia, sendo ainda isolante térmico^{4,5}. Diversas formas de preparação de própolis vêm sendo utilizadas na medicina popular. Suas

aplicações são conhecidas desde a antiguidade e sua ação terapêutica é comprovada em diversas propriedades farmacológicas¹.

A composição da própolis apresenta variações regionais e sazonais^{6,7} e a amplitude de suas atividades terapêuticas é maior em amostras provenientes de regiões tropicais como reflexo da diversidade vegetal⁸. No Brasil a própolis foi classificada em 12 grupos distintos de acordo com suas características físico-químicas⁹. Posteriormente foi descrita uma nova variedade, advinda de colmeias encontradas ao longo do litoral e rios do nordeste brasileiro, classificada como própolis do grupo 13 e conhecida como própolis vermelha^{10,11}, que difere das demais por sua origem botânica, derivada especialmente de exudato resinoso vermelho da superfície de *Dalbergia ecastophyllum*^{12,13}.

Na própolis vermelha já foram descritos alguns compostos não encontrados em outras variedades, como composto fenólicos simples, triterpenoides, isoflavonoides, prenilado, benzofenonas e a naftoquinona epoxidada, sendo, este último, nunca antes isolado a partir de uma fonte natural^{13,14}. Apresenta propriedades antimicrobianas¹⁵, anti-cárie¹⁶, anti-inflamatória¹⁷, antioxidante^{7,18}, antitumoral^{19,20,21}, imunomodulatória²², e cicatrizante²³.

A genética toxicológica, por meio de diferentes bioensaios, tem demonstrado que existe alta correlação entre agentes genotóxicos e o desenvolvimento de processos carcinogênicos²⁴. Estudos de potencial genotóxico realizados com amostras de própolis originada em biomas do cerrado brasileiro não apresentaram atividade mutagênica^{25,26}, indicando ainda ação protetora contra agentes mutagênicos^{27,28}.

O teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) utiliza como organismo a *Drosophila melanogaster*, com vantagens de ter curto período de geração, pequeno número de cromossomos, linhagens geneticamente bem caracterizadas e apresentar um espectro de atividade metabólica capaz de ativar promutágenos e procarcinógenos^{29,30}. O SMART vem se mostrando uma importante ferramenta e com resultados confiáveis para o estudo de mutagenicidade/recombinogenicidade de diversas substâncias como compostos sintéticos^{31,32} e produtos de origem natural, tanto isolados^{33,34,35}, quanto em misturas complexas^{36,37,38}.

Diante da utilização popular da própolis, sua importância econômica, suas propriedades biológicas já comprovadas e da necessidade de mais conhecimentos, especialmente sobre a variedade produzida na região nordeste do Brasil, este trabalho teve como objetivo avaliar amostras de própolis vermelha por meio do teste de mutação e recombinação somática (SMART) em células de asas de *D. melanogaster*, e verificar a influência da ativação metabólica pelo P450 no potencial mutagênico/antimutagênico dessa substância.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de própolis utilizadas foram provenientes do Apiário Capivara (S 10°28'25'' e W 36°26'12''), localizado no município de Brejo Grande, foz do Rio São Francisco, litoral norte do estado de Sergipe (Brasil) e coletadas em outubro de 2010 (índice pluviométrico 109,2 mm; temperaturas máxima de 28°C e mínima de 21,5°C para esse período na região)³⁹. Após a coleta, as amostras em estado bruto foram mantidas congeladas em freezer (-20°C) até o momento da preparação do extrato.

O extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) foi preparado adicionando-se 750 mL de água destilada a cada 100 g de própolis bruta triturada e mantida em repouso para hidratação por um período de 24 horas. A solução foi aquecida a 60°C por 4 horas em banho-maria, seguida de 2 horas em ultrassom (40KHz, Ultra Cleaner 1400), realizando-se uma primeira filtragem em algodão e uma segunda filtragem em papel de filtro qualitativo^{40,25,27}. O filtrado foi liofilizado e, no momento dos tratamentos, ressuspenso em água destilada esterilizada nas concentrações de 0,125; 0,25; 0,5 mg/mL. As concentrações foram determinadas de acordo com relatos da literatura com a utilização de extratos aquosos de própolis para tratamento crônico de larvas de *D. melanogaster*^{25, 27}.

As linhagens mutantes de *D. melanogaster*, *mwh* (*y; mwh jv*), *flare-3* (*flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) e *ORR*; *flare-3* (*ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) foram mantidas em frascos de 1/4 de litro contendo meio de cultura para *Drosophila* (820 mL de

água; 25 g de fermento biológico; 11 g de ágar; 150 g de polpa de banana e 1 g de metilparabeno). Foram realizados os cruzamentos padrão (ST) (fêmeas virgens *flr-3* cruzadas com machos *mwh*)^{29,41}; e de alta capacidade de ativação metabólica (HB) (fêmeas virgens ORR; *flr-3* cruzadas com machos *mwh*)⁴².

Ovos originados a partir dos cruzamentos ST e HB foram coletados durante 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. Após 72 ± 4 h, as larvas de 3º estágio foram lavadas com água destilada, coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina e transferidas para frascos contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Yoki®) e 5 mL das diferentes concentrações de EAPV (0,125; 0,25; 0,5 mg/mL). Os tratamentos foram realizados simultaneamente por um período de aproximadamente 48 horas (tratamento crônico)⁴³, em frascos âmbar, para evitar a possibilidade de foto-degradação dos compostos.

Como controle positivo foi utilizado uretano (URE – etil carbamato, $C_3H_7NO_2/NH_2COOC_2H_5$, massa molecular 89.09 u, CAS N° 51-79-6, Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), na concentração 0,891 mg/mL, devido às suas propriedades mutagênicas bem estabelecidas e sua ativação metabólica pelo citocromo P450^{42,44,45}. Para o controle negativo foi utilizada água destilada esterilizada.

Adultos emergentes de ambos os cruzamentos (ST e HB), portadores dos genótipos trans-heterozigotos marcados (Marker-heterozygous MH) (*mwh + / + flr³*) e heterozigotos balanceados (Balancer-heterozygous - BH) (*mwh + / + TM3, Bd^S*) foram coletados e conservados em etanol 70%. As asas foram extraídas das moscas com auxílio de microscópio estereoscópico, utilizando-se um par de pinças entomológicas. As asas foram fixadas entre lâmina e lamínula com solução de Faure (30 g de goma arábica, 20 mL de glicerol, 50 g de hidrato cloral e 50 mL de água) e analisadas, quanto à ocorrência dos diferentes tipos de manchas mutantes (manchas simples pequenas – MSP, manchas simples grandes – MSG e manchas gêmeas – MG), em microscópio óptico de luz com aumento de 400 X. Os adultos MH e BH puderam ser diferenciados fenotipicamente, pois o marcador *Bd^S* (presente nos descendentes BH) provoca, durante a metamorfose, um recorte na borda das asas, deixando-as com aspecto serrilhado, enquanto que os adultos MH apresentam asas com bordas lisas^{29,46}.

A análise estatística dos dados foi feita de acordo com o teste do X^2 para proporções, bicaudal, com nível de significância $\alpha=\beta=0,05$ ⁴⁷, comparando as frequências obtidas entre os grupos tratados e controle negativo de cada cruzamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise microscópica das asas de 20 indivíduos (10 machos e 10 fêmeas) trans-heterozigotos marcados (MH) de cada tratamento com as diferentes concentrações de EAPV e respectivos controles, descendentes do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta capacidade de ativação metabólica (HB), mostrou que as frequências de manchas mutantes simples pequenas (MSP), manchas simples grandes (MSG), manchas gêmeas (MG) e o total de manchas (TM) observadas nos tratamentos com as diferentes concentrações de EAPV, foram estatisticamente não significativas ou inconclusivas ($\alpha>0,05$) quando comparadas às frequências obtidas em seus respectivos controles negativos (água destilada esterilizada), tanto no cruzamento ST quanto HB (Tabela 1).

Foi verificado um aumento estatisticamente significativo ($\alpha<0,05$) nas frequências de manchas mutantes simples pequenas (MSP) e no total de manchas (TM) nos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, e também nas manchas simples grandes (MSG) e manchas gêmeas (MG) nos descendentes MH do cruzamento HB, tratados com URE (0,891 mg/mL), quando comparadas às frequências do controle negativo (água destilada esterilizada).

Uma vez observado o efeito positivo de URE, é possível afirmar que os resultados negativos obtidos com as diferentes concentrações de EAPV são legítimos e não deficiência ou falha da metodologia empregada³⁰.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências de manchas mutantes dos descendentes MH dos cruzamentos padrão (ST) quando comparados com o cruzamento de

alta capacidade de ativação metabólica (HB) nos mesmos grupos de tratamentos com as diferentes concentrações (0,125; 0,25; 0,5 mg/mL) de EAPV.

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de Drosophila melanogaster dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de ativação metabólica (HB) após tratamento crônico em terceiro estágio larval com diferentes concentrações (0,125; 0,25; 0,50 mg/mL) de extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) e seus respectivos controles negativo (água destilada esterilizada) e positivo (URE 0,891 mg/mL)

| Tratamentos (mg/mL) | Nº de Indiv. (N) | Manchas por indivíduo (nº de manchas) diag. estatístico ^a | | | | Total Manchas mwh ^c (n) |
|------------------------|------------------------|--|--|-------------|--------------------------|---|
| | | MSP (1-2 céls) ^b m = 2 | MSG (>2 céls) ^b m = 5 | MG m = 5 | TM ^b m = 2 | |
| Cruzamento ST | | | | | | |
| Controle negativo | 20 | 0,55 (11) | 0,05 (01) | 0,05 (01) | 0,65 (13) | 13 |
| EAPV 0,125 | 20 | 0,35 (07) - | 0,10 (02) i | 0,00 (00) i | 0,45 (09) - | 9 |
| EAPV 0,25 | 20 | 0,45 (09) - | 0,10 (02) i | 0,05 (01) i | 0,60 (12) - | 11 |
| EAPV 0,50 | 20 | 0,45 (09) - | 0,00 (00) i | 0,05 (01) i | 0,50 (10) - | 9 |
| URE 0,891 | 20 | 2,05 (41) + | 0,30 (06) i | 0,10 (02) i | 2,45 (49) + | 48 |
| Cruzamento HB | | | | | | |
| Controle negativo | 20 | 0,80 (16) | 0,15 (03) | 0,05 (01) | 1,00 (20) | 20 |
| EAPV 0,125 | 20 | 0,65 (13) - | 0,05 (01) i | 0,05 (01) i | 0,75 (15) - | 14 |
| EAPV 0,25 | 20 | 0,70 (14) - | 0,05 (01) i | 0,00 (00) i | 0,75 (15) - | 15 |
| EAPV 0,50 | 20 | 0,65 (13) - | 0,10 (02) i | 0,00 (00) i | 0,75 (15) - | 14 |
| URE 0,891 | 20 | 7,90 (158) + | 0,55 (11) + | 0,40 (08) + | 8,85 (177) + | 157 |

^aDiagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância $\alpha = \beta = 0,05$.

^bIncluindo manchas simples *flr*³ raras.

^cConsiderando os clones mwh para as manchas simples mwh e para as manchas gêmeas.

Os resultados negativos encontrados nos descendentes MH do cruzamento HB indicam que EAPV, nas condições experimentais utilizadas, não contém pró-mutágenos em sua constituição e que as enzimas do complexo citocromo P450, altamente expressas na linhagem “ORR; *flr*^{3,42}, não interferem em seu potencial genotóxico. A maior frequência de manchas mutantes observadas no cruzamento HB tratados com URE (0,891 mg/mL), em relação ao cruzamento ST, é provocada pela ativação metabólica do URE pelo sistema enzimático P450, potencializando sua atividade mutagênica^{44,45}.

Manchas mutantes ocorridas em descendentes MH indicam a ocorrência de mutação de ponto, aberrações cromossômicas e recombinação somática, enquanto os descendentes BH detectam apenas mutação de ponto e aberrações cromossômicas^{41,42}. A ausência de resultados mutagênicos positivos nos descendentes MH tratados com as diferentes concentrações de EAPV, tanto no cruzamento ST quanto HB, torna não necessária a análise dos descendentes BH de ambos os cruzamentos^{25,30}.

Não foram encontrados relatos na literatura de estudos de genotoxicidade com a própolis vermelha originária da região nordeste brasileira. A ausência de efeitos genotóxicos observada nesse trabalho coincide com resultados obtidos em estudos por meio do SMART com amostras de própolis verde^{25,27} e marrom²⁸, ambas de regiões do cerrado brasileiro, e por meio de outros sistemas de avaliação, como teste de Ames^{48,49}, teste cometa⁵⁰ e teste do micronúcleo⁵¹. No entanto, altas concentrações de própolis aumentam a frequência de aberrações cromossômicas em células ovarianas de hamster chinês⁵², induzem troca entre cromátides irmãs e reduzem os índices mitótico e proliferativo em cultura de linfócitos humanos⁵³.

A Figura 1 mostra a distribuição das frequências de manchas por classe de tamanho (número de células mutantes/mancha) observadas em asas de descendentes MH provenientes dos cruzamentos ST e HB, tratados com as diferentes concentrações de EAPV e seus respectivos controles negativo e positivo.

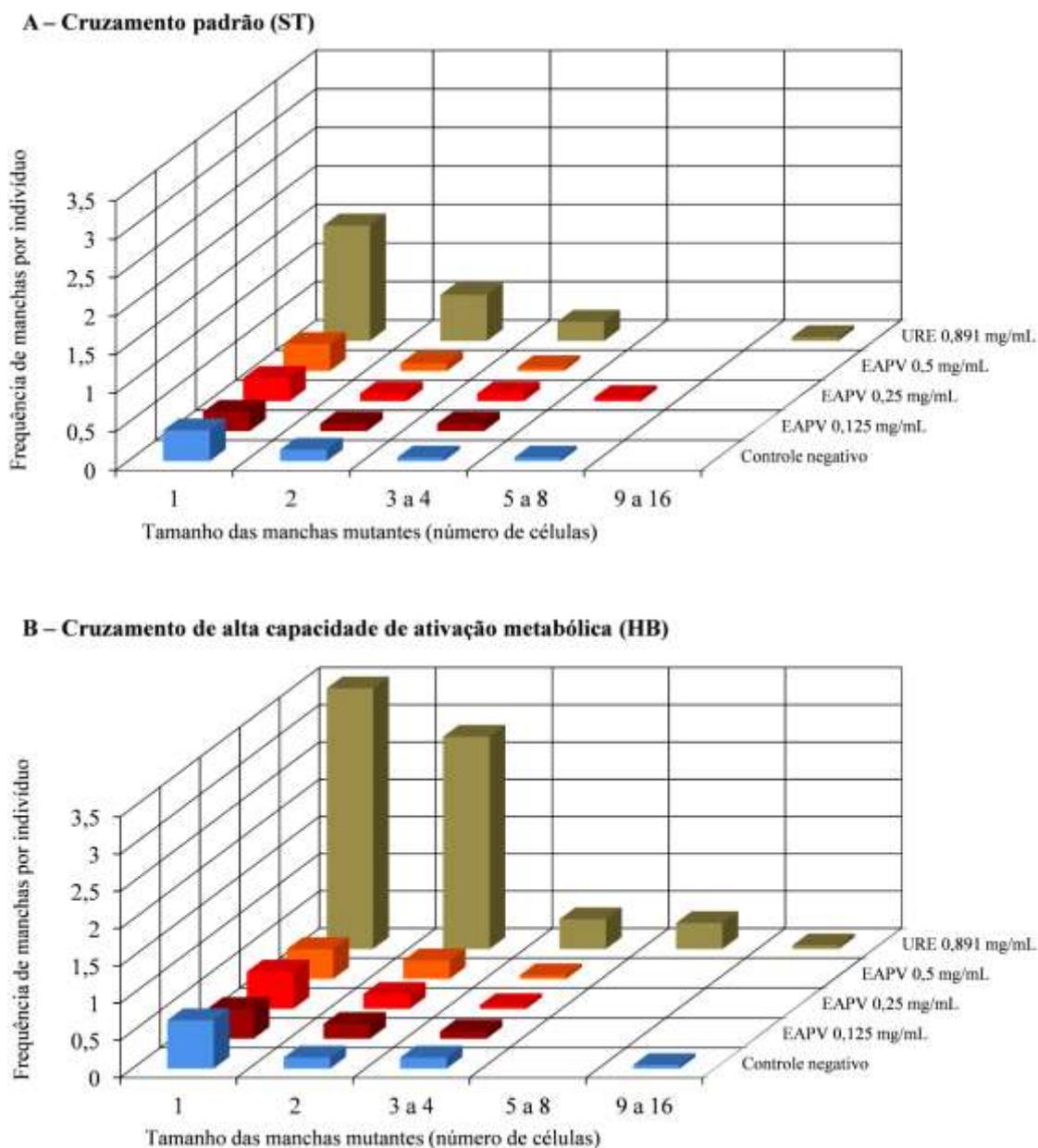


Figura 1 – Distribuição das frequências de manchas mutantes por classe de tamanho (número de células *mwh*) observadas em asas de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST (A) e HB (B) após tratamento crônico em terceiro estágio larval com diferentes concentrações (0,125; 0,25; 0,50 mg/mL) de extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV) e seus respectivos controles negativo (água destilada esterilizada) e positivo (URE 0,891 mg/mL).

O tratamento crônico de indivíduos MH com as diferentes concentrações de EAPV resultou em uma distribuição do tamanho de manchas mutantes na qual observa-se a predominância de manchas pequenas (com apenas uma célula), enquanto manchas maiores aparecem em frequência decrescente, de acordo com o aumento do número de células mutantes presentes nas manchas. Estes resultados estão de acordo com outros relatados na literatura^{25,29,46,54}.

A prevalência de manchas pequenas, observadas nas asas dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, demonstra que nas diferentes concentrações de EAPV utilizadas, assim como no controle negativo, as mutações nas células dos discos imaginais de asas ocorreram numa fase tardia do desenvolvimento das larvas de *D. melanogaster*. Manchas formadas em

estágios iniciais do desenvolvimento apresentam um número maior de células, que é o caso da menor quantidade de manchas encontradas neste experimento^{29,55}.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, é possível concluir que o extrato aquoso de própolis vermelha (EAPV), nas condições experimentais utilizadas, não apresentou efeitos mutagênicos, clastogênicos e/ou recombinogênicos, com ou sem ativação metabólica por enzimas do sistema citocromo P450, em células somáticas de *D. melanogaster*. Considerando a importância da própolis, sugere-se a realização de novos estudos para avaliar composição química e a variabilidade sazonal de amostras de própolis vermelha coletadas em diferentes localidades e suas propriedades mutagênicas/antimutagênicas.

5. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho recebeu apoio financeiro por meio de bolsa PIBIC/COPES/UFS. Foram utilizados equipamentos do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe. As linhagens de *D. melanogaster* foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (INGEB-UFU) e as amostras em estado bruto de própolis vermelha, providenciadas pelo Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe.

-
1. Ghisalberti EL. Propolis: A review. *Bee World*, 1979; 60:59-84.
 2. Franco SL, Bruschi ML, Moura LPP, Bueno JHP. Avaliação Farmacognóstica da própolis da região de Maringá. *Rev Bras Farmacogn*, 2000; 9:1-10.
 3. Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino-Neto FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova*, 2002; 25:321-326.
 4. Manara LRB, Gromatzky A, Conde MC, Bretz WA. Utilização da própolis em Odontologia, *Rev FOB*, 1999; 7(3/4):15-20.
 5. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 1995; 26:83-99.
 6. Nunes LCC, Galindo AB, de Deus ASO, Rufino DA, Randau KP, Xavier HS, Citó AMGL, Neto PJR. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Braz J Pharmacog*, 2009; 19(2B): 524-529.
 7. Nunes LCC, Galindo AB, Lustosa SR, Brasileiro MT, Do Egito AA, Freitas RM, Randau KP, Rolim-Neto PJ. Influence of seasonal variation on antioxidant and total phenol activity of red propolis extracts. *Adv Stud Biol*, 2013; 5(3):119-133.
 8. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol*, 2005; 100:114-117.
 9. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *J Agr Food Chem*, 2002; 50:2502-2506.
 10. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2008; 5(3): 313-316.
 11. Costa AS, Machado BAS, Umsza-Guez MA, Cirqueira MG, Nunes SB, Padilha FF. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, 2013; 13:1-7.
 12. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Pacheco E, Lima IB, Abreu JA, Park YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica [Internet]. São Paulo (SP): Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíferas Europeias, Mensagem Doce, 86; 2006 [acesso 2014 mai 28]. Disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>.
 13. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian Red Propolis – Chemical Composition and Botanical Origin. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2008; 5(4):435-441.
 14. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin FR, Tsvetkova I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid-Based Compl Alt*, 2006; 3(2):249-254.

15. Inui S, Hatano A, Yoshino M, Takahiro H, Shimamura Y, Masuda S, Ahn MR, Tazawa S, Araki Y, Kumazawa S. Identification of the phenolic compounds contributing to antibacterial activity in ethanol extracts of Brazilian red propolis. *Nat Prod Res*, 2014; 28(16):1293–1296.
16. Bueno-Silva B, Koo H, Falsetta ML, Alencar SM, Ikegaki M, Rosalen PL. Effect of neovestitol–vestitol containing Brazilian red propolis on accumulation of biofilm in vitro and development of dental caries in vivo. *Biofouling*, 2013; 29(10):1233–1242.
17. Bueno-Silva B, Alencar SM, Koo H, Ikegaki M, Silva GVJ. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Evaluation of Neovestitol and Vestitol Isolated from Brazilian Red Propolis. *J Agric Food Chem*, 2013; 61:4546–4550.
18. Cabral ISR, Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quim Nova*, 2009; 32(6):1523–1527.
19. Novak EM, Silva MSC, Marcucci MC, Sawaya ACHF, López BGC, Fortes MAHZ, Giorgi RR, Marumo KT, Rodrigues RF, Maria DA. Antitumoural activity of Brazilian red propolis fraction enriched with xanthochymol and formononetin: An in vitro and in vivo study. *J Funct Food*, 2014; 11:91–102.
20. Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T. Ethanol Extract of Brazilian Red Propolis Induces Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress. *J Agr Food Chem*, 2012; 60(44):11065–11070.
21. Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorgan Med Chem*, 2008; 16(1):181–189.
22. Freitas JÁ, Vanat N, Pinheiro JW, Balarin MRS, Sforcin JM, Venancio EJ. The effects of propolis on antibody production by laying hens. *Poultry Sci*, 2011; 90(6):1227–1233.
23. Batista LLV, Campesatto EA, Assis MLB, Grillo LAM, Dornelas CB. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev Col Bras Cir*, 2012; 39(6):515–520.
24. Andrade HHR, Lehmann M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. In: Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK (org). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: ULBRA; 2003. p. 281–307.
25. Valadares BLB, Spanó MA, Nepomuceno JC. Ausência de efeitos genotóxicos de um extrato aquoso de própolis (EAP) em células somáticas de *Drosophila melanogaster*. *Biosci J*, 2004; 20(1):123–129.
26. Oliveira IG, Pereira KC, Guimarães CC, Moraes TN, Chen LC, Cunha KS. Avaliação comparativa dos efeitos tóxicos-genéticos da própolis em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, portadoras de diferentes níveis de metabolização. *Rev Biol Neotrop*, 2007; 4(1): 64–69.
27. Valadares BLB, Graf U, Spanó MA. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 2008; 46:1103–1110.
28. Fernandes FH, Guterres ZR, Garcez WS, Lopes SM, Corsino J, Garcêz FR. Assessment of the (anti)genotoxicity of brown propolis extracts from Brazilian Cerrado biome in a *Drosophila melanogaster* model. *Food Res Int*, 2014; 59:20–26.
29. Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, 1984; 6:153–188.
30. Valadares BLB, Silva LM, Oliveira JS, Moreira ALC. Teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*: uma importante ferramenta na avaliação de genotoxicidade ambiental e na avaliação de agentes mutagênicos e antimutagênicos naturais e sintéticos. In: Reis IF, Reis JBA, Barbiéri RS (org). *Tópicos em Ciências Naturais e da Saúde*. Caratinga: UNEC; 2010. p. 233–250.
31. Fragiorge EJ, Rezende AAA, Graf U, Spanó MA. Comparative genotoxicity evaluation of imidazolinone herbicides in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 2008; 46:393–401.
32. Fragiorge EJ, Antunes LMG, Spanó MA. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet Mol Biol*, v. 30, p. 449–455, 2007.
33. Rezende AAA, Munari CC, Oliveira PF, Ferreira NH, Tavares DC, Silva MLA, Rezende KCS, Spanó MA. A comparative study of the modulatory effects of (-)-cubebin on the mutagenicity / recombinogenicity induced by different chemical agents. *Food Chem Toxicol*, 2013; 55:645–652.
34. Rezende AAA, Silva MLA, Tavares DC, Cunha WR, Rezende KCS, Bastos JK, Lehmann M, Andrade HHR, Guterres ZR, Spanó MA. The effect of the dibenzylbutyrolactolic ligan (-)-cubebin on doxorubicin mutagenicity and recombinogenicity in wing somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Food Chem Toxicol*, 2011; 49:1235–1241.

35. Rezende AAA, Graf U, Guterres ZR, Kerr WE, Spanó MA. Protective effects of proanthocyanidins of grape (*Vitis vinifera* L.) seeds on DNA damage induced by Doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Food Chem Toxicol, 2009; 47:1466-1472.
36. Rezende VB, Lins AB, Rezende AAA, Spanó MA, Sousa NC. Avaliação do efeito modulador da levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* M.) sobre a genotoxicidade induzida pela doxorubicina em *Drosophila melanogaster*. Rev Biol Neotrop, 2013; 10:9-17.
37. Sousa NC, Graf U, Guterres ZR, Rezende AAA, Silva RMG, Kerr WE, Spanó MA. Modulatory effects of *Tabebuia impetiginosa* (Lamiales, Bignoniaceae) on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. Genet Mol Biol, 2009; 32:382-388.
38. Pereira DG, Antunes LMG, Graf U, Spanó MA. Protection by *Panax ginseng* C.A. Meyer against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. Genet Mol Biol, 2008; 31:947-955.
39. SEMARH. Dados diários de precipitação de alguns municípios de Sergipe, Mês: Outubro/2008 [Internet]. Aracaju (SE): Secretaria de Estado do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos, Centro de Meteorologia da SEMARH/SRH [acesso 2014 nov 14]. Disponível em: <http://www.semarh.se.gov.br/meteorologia/modules/wfdownloads/visit.php?cid=1&lid=91>
40. Matsushiger K, Basnet P, Hase K, Kadota S, Tanara K, Namba T. Propolis protects pancreatic b-cells against the toxicity of streptozonic (STXZ). Phytomedicine, 1996; 3:203-209.
41. Graf U, Frei H, Kägi A, Katz AJ, Würigler FE. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. Mutat Res, 1989; 271:59-67.
42. Graf U, Van Schaik N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res, 1992; 271:59-67.
43. Graf U. Analyses of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. Experientia, 1995; 51:168-173.
44. Frölich A, Würigler FE. Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. Mutat Res, 1990; 244:201-208.
45. Dogan EE, Yesilada E, Ozata L, Yologlu S. Genotoxicity testing of four textile dyes in two crosses of *Drosophila* using wing somatic mutation and recombination test. Drug Chem Toxicol, 2005; 28:335-338.
46. Rodrigues-Arnaiz R, Orozco-Soto P, Gaytán-Oyarzún JC, Graf U. Analysis of mitotic recombination induced by several mono- and bifunctional alkylating agents in *Drosophila* wing spot test. Mutat Res, 1996; 351:133-146.
47. Frei H, Würigler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. Mutat Res, 1988; 203:297-308.
48. Bariliak IR, Berdyshev GD, Dugan AM. The antimutagenic action of apicultural products. Tsitol Genet, 1996; 30(6):48-55.
49. Varanda EA, Monti R, Tavares DC. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct- and indirect-acting mutagens. Teratogen Carcin Mut, 1999; 19:403-413.
50. Bazo AP, Rodrigues MAM, Sforcin JM, Camargo JLV, Ribeiro LR, Salvadori DMF. Protective action of propolis in the rat colon carcinogenesis. Teratogen Carcin Mut, 2002; 22:183-194.
51. Santos GS, Tsutsumi S, Vieira DP, Bartolini P, Okazaki K. Effect of Brazilian propolis (AF-08) on genotoxicity, cytotoxicity and clonogenic death of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells irradiated with 60Co gamma-radiation. Mutat Res-Gen Tox En, 2014; 762: 17-23.
52. Tavares DC, Mazzaron-Barcelos GR, Silva LF, Chacon-Tonin CC, Bastos JK. Propolis-induced genotoxicity and antigenotoxicity in Chinese hamster ovary cells. Toxicol In Vitro, 2006; 20(7):1154-1158.
53. Montoro A, Soriano JM, Barquinero JF, Almonacid M, Montoro A, Verdú G, Sahuquillo V, Villaescusa JI, Sebastià N. Assessment in vitro of cytogenetic and genotoxic effects of propolis on human lymphocytes. Food Chem Toxicol, 2012; 50(2):216-221.
54. Spanó MA, Frei H, Würigler FE, Graf U. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. Mutagenesis, 2001; 16(5):385-394.
55. Graf U, Moraga AA, Castro R, Carrillo ED. Genotoxicity testing of different types of beverages in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. Food Chem Toxicol, 1994; 32(5):423-430.